

A poliubiquitin receptorok fejlődésstádium-specifikus szabályozása *Drosophila melanogaster*ben

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Lipinszki Zoltán

Témavezető: Dr. Udvardy Andor

SZTE-TTIK, Biológia Doktori Iskola

MTA SZBK, Biokémia Intézet

Szeged

2009.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
BEVEZETÉS	4
- Előszó	4
- Tudománytörténeti bevezetés	5
- Az ubiquitin-ligáz enzimkaskád és az ubiquitin jel	7
- A 26S proteaszóma	11
- A 20S proteaszóma	13
- A 19S regulátor komplex	15
- A poliubiquitin receptorok	19
- A poliubiquitin receptorok működésének összefoglalása	25
CÉLKITŰZÉSEK	28
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
- <i>In vivo</i> kísérletek és mintagyűjtés	30
- <i>In vitro</i> módszerek	32
EREDMÉNYEK	40
- A különleges alegység: p54.....	40
- A poliubiquitin receptorok sorsa az egyedfejlődés folyamán	42
- A poliubiquitin receptorok degradálódnak az egyedfejlődés korai lárvális szakaszában.....	48
- A p54-nek csak a C-terminális fele degradálódik a lárvális stádiumokban	53
- A p54 fehérje különböző darabjainak túltermeltetése transzgénikus muslicákban.....	55
- A CTF terminális lizinjei ubiquitilálódnak	59
- A CTF termelődése megzavarja a poliubiquitin receptorok fejlődésszabályozását	63
- A Dsk2-p54 kölcsönhatás esszenciális az ubiquitin-proteaszóma rendszer működéséhez.....	67
DISZKUSSZIÓ.....	74
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	81
IRODALOMJEGYZÉK	82
ÖSSZEFOGLALÓ	92
SUMMARY	95
MELLÉKLETEK	98

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

8SC – a Strep-p54 C-terminálisát kódoló transzgént hordozó alaptörzs neve
AAA – AAA ATPáz domén
AAA-ATPáz – számos sejtes aktivitással-asszociált ATPáz (ATPases associated with various cellular activities)
AMP – adenzin 5'-monofoszfát (adenosine 5'-monophosphate)
APC/C – anafázist propagáló komplex/cikloszóma (Anaphase promoting complex/cyclosome)
APF-1 – ATP függő proteolízis faktor-1 (ATP-dependent proteolysis factor-1)
as. – aminosav
ATP – adenzin 5'-trifoszfát (adenosine 5'-triphosphate)
ATPáz – adenzin 5'-trifoszfát bontásra utaló enzimaktivitás
bp – DNS bázispár
C18 – a p54 C-terminálisát kódoló transzgént hordozó alaptörzs
CBD – kitin-kötő domén (Chitin-binding domain)
CDK – ciklin-függő kináz (Cyclin-dependent kinase)
cDNS – komplementer DNS (complementary DNA)
CP – a 26S proteaszóma 20S központi partikuluma (Central Particle)
C-terminális – a fehérje karboxi-terminális vége (vagy fele)
CTF – a p54 fehérje karboxi-terminális fele
CyO – balanszer kromoszóma *Cy* (*Curly* – felfelé pöndörödő szárny) markerrel (FBba0000025)
Δ – valaminek a hiánya
ΔK – a p54 terminális lizinjeinek hiánya
da – *daughterless* (általános kifejeződést elősegítő promóter)
Dm – *Drosophila melanogaster*
dsRNS – duplaszálú RNS, az RNS-interferencia jelenséget indukálja
Dsk2 – UBA/UBL extraproteasómális poliubiquitin receptor
DTT – ditio-treitol (enyhe redukálószer)
DUB – deubiquitiláló enzim
E1 – ubiquitin-aktiváló enzim
E2 – ubiquitin-konjugáló enzim
E3 – ubiquitin-ligáz enzim
E4 – az ubiquitin lánc meghosszabbítását végző enzim
EE – embrió összfehérje-extraktum
ERAD – endoplazmatikus retikulumhoz asszociált degradáció – a fehérjék minőségellenőrzése
Extraproteasómális – a proteasómától független
g/v – vegyesszázalék (gramm anyag 100 ml oldatban)
Gal4 – az élesztő UAS-re specifikus transzkripció faktor
Gal80^{ts20} – a Gal4 termo-szenzitív represszora
GSH – redukált glutation
GST – glutation-S transzferáz
h – óra
HECT – az E6-AP E3-ligázra jellemző domén (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus)
HbYX – a regulátor komplex ATPáz alegységeinek C-terminális motívumai (Hidrofób (Hb) – tirozin (Y) – bármilyen (X)), melyek a 20S proteaszóma kapunyitásban játszanak szerepet
HRP – torna-peroxidáz (horseradish-peroxidase)
Hs – *Homo sapiens*
If – domináns genetikai marker (*Irregular facets* - rés szem) a 2. kromoszómán (FBal0005583)
K – a lizin aminosav egybetűs nemzetközi kódja
kDa – molekulatömeg (kilo-Dalton)

mAt – monoklonális antitest
MDa – molekulatömeg (Mega-Dalton)
MG132 – specifikus proteaszóma gátló vegyület
MKRS – balanszer kromoszóma *Sb* (*Stubble* – borostás szőrözöttség) markerrel (FBba0000066)
mRNS – hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic-acid)
Ndf – N-terminális degradációs fragment
N-terminális – a fehérje aminoterminális vége (vagy fele)
NTF – a p54 fehérje amino-terminális fele
ODC – ornitin-dekarboxiláz; a proteaszóma ubiquitilátatlan szubsztátja
P-elem – valamely kromoszómára integrálódott, a vizsgálni kívánt mesterséges transzgént hordozó mobilis genetikai (P) elem
p54 – a proteaszóma poliubiquitin receptora
PAGE – poliakrilamid gélelektroforézis
pAt – poliklonális antitest
PCR – polimeráz láncreakció
PIPs – proteaszómával kölcsönható fehérjék (proteasome interacting proteins)
PMSF – fenil-metil-szulfonil-fluorid, specifikus szerin-proteáz gátló vegyület
poliUb – poliubiquitin
Pros54 – a p54 fehérjét kódoló *Drosophila* gén
Pru – pleckstrin-szerű ubiquitin receptor domén (pleckstrin-like receptor for ubiquitin)
PVDF – polivinilidín-fluorid, fehérjék megkötésére használatos membrán
Rad23 – UBA/UBL extraproteaszómális poliubiquitin receptor
RC – a 26S proteaszóma 19S regulátor komplexuma (Regulatory Complex)
RING – egyes E3-ligázokra jellemző cink-ujj motívumok (Really Interesting New Gene)
Rpt – regulátor partikulum tripla-ATPáz alegységek (Regulatory Particle of triple-ATPase)
Rpn – regulátor partikulum nem-ATPáz alegységek (Regulatory Particle non-ATPase)
RT-PCR – reverz transzkripcióval kapcsolt PCR
Sc – *Saccharomyces cerevisiae*
Scc1 – a kohezin-komplex N-degront hordozó alegysége
SCF – Skp, Cullin és F-boxból összeálló E3-ligáz komplexum
SDS – nátrium-dodecyl-szulfát anionos detergens (Sodium-dodecyl-sulphate)
SUMO – ubiquitin-szerű (Ubl) módosító fehérje (small ubiquitin-like modifier)
TBS – Tris-sel puffertelt sóoldat
TBST – TBS+Tween-20 detergens oldat
TCA – triklór-ecetsav (a fehérjék kicsapása során alkalmazott vegyület)
TM6B – balanszer kromoszóma *Tb* (*Tubby* – gömbölyded lárva és báb) és *Hu* (*Humeral* - extra szőrök az adult humerális zónájában) markerekkel (FBba0000066)
UAS – enhancer analóg az élesztőben, a Gal4 transzkripció faktor kötőhelye (upstream activating sequence)
Ub – ubiquitin: hőstabil polipeptid, amely kovalensen kötődhet valamely fehérje lizinjére.
Uba – ubiquitin aktiváló enzim (E1)
UBA – ubiquitinnel asszociáló domén (Ubiquitin-Associated domain)
Ubc – ubiquitin konjugáló enzimek (E2)
UBL – ubiquitin-szerű domén (Ubiquitin-like domain)
Ubl – ubiquitin-szerű fehérjék
UCH – ubiquitin C-terminális hidroláz
UIM – ubiquitinnel kölcsönható motívum (Ubiquitin Interacting Motif)
VDRC – bécsi *Drosophila* RNS-interferencia központ (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>)
v.k. – végkoncentráció
v/v – térfogatszázalék (ml anyag 100 ml oldatban)
vWA – von Willebrand-A faktorra jellemző domén

BEVEZETÉS

„Az alapkutatás haszna sohasem mutatkozik meg olyan hamar, mint az alkalmazott kutatásé, de nem is szűnik meg olyan gyorsan.”

(Selye János: Álomtól a felfedezésig)

Előszó

Mi az élet? Honnan jöttünk, hogyan, mikor és miért lettünk? Ilyen és ehhez hasonló filozófiai kérdésekre keresi, és részben találja meg^{1,2} (kivéve talán a miért-et) a választ az öntudat, az ismeretlen megismerésének vágya és a kutatni akarás képességével rendelkező *Homo sapiens*. Egyről jut a kettőre, majd a háromra, juhokat keresztez a jobb utódlás érdekében, leteszi a genetika alapjait, kristályokat válogat szét, megismeri a sejtet, a sejtek szerveződését, létrejönnek az „omikák”, és Nobel-díjjal, vagy más kitüntető címmel jutalmazza embertársait, akik hozzásegítik létének megértéséhez.

Mai elképzelésünk szerint az élet biokémiája rendkívül összetett folyamat. Az elmúlt évtizedekben dogmák százai tették le a sejt működésének biokémiai alapjait, de ennek ellenére még ma is számos izgalmas és érdekes megfigyelésről számolnak be a tudományos folyóiratok. Kezdve a gének működtetésétől, az RNS molekulák újfajta szabályozó szerepén át, egészen a fehérjék bonyolultan funkcionáló világáig. Ma már minden biológiával foglalkozó embernek egyértelmű, hogy a legtöbb protein dinamikusan változó biokatalizátor, amelynek mennyisége a sejt egy adott életpillanatában a szintézise és lebontása arányától függ. A fehérjék eltávolításában szerepet játszó ubiquitin-proteaszóma rendszer, amely működéséről ma már sokat, de egyben nagyon keveset is tudunk, pedig csak egy töredéke annak a bonyolult biokémiai hálózatnak, amely a proteóm összetettségét befolyásolva a sejtek homeosztázisának fenntartásában vesz részt. A dolgozatomban leírtakkal, még ha egy csipetnyit is, de ennek a területnek a jobb megértéséhez szeretnék hozzájárulni.

Tudománytörténeti bevezetés

Az 1950-1980-as évek közti időszak egyik legfontosabb kérdése az volt, hogy hogyan fordítódik át a genetikai információ RNS-re, majd fehérjékre. Valójában még a '40-es évek elejéig is úgy tartották, hogy a szervezetünket felépítő fehérjék sérthetetlenek, elnyűhetetlenek („wear-and-tear”), s csak és kizárólag a táplálékkal bejutatott proteineket tudjuk megemésztetni, hogy építőelemeiket anabolikus folyamatainkban felhasználjuk. Néhány kutató kétségbe vonta az elmélet valóságát, de megfelelő nyomjelzési technikák (pl. izotópok) hiányában sem bizonyítani, sem pedig cáfolni nem tudták azt.

Ez az ortodox „dogma” megdőlni látszott, miután Rudolf Schoenheimer³ és kollégái, izotópos nyomjelzés technikával, pasteuri precizitással és pontossággal végzett patkánykísérleteik eredményeit bemutatták. Elsőként a világon ¹⁵N-nel jelölt tirozint (vagy leucint) injektáltak patkányokba. Meglepetésükre a vizeletben megjelent ¹⁵N-tirozin a bejuttatott mennyiségnek csak a fele volt, míg a maradék 50% a szöveti fehérjékben, sőt, a fehérjékben nem csak a tirozinban, hanem a legtöbb vizsgált aminosavféleség aminocsoportjában jelent meg^{4,5}. Elgondolásuk szerint, a szöveti fehérjék degradációjára és felépítésére, valamint az egyes aminosavak egymásba alakulására egyfajta szigorú dinamizmus jellemző a sejten belül is. Az elméletet a tudományos közvélemény hosszú évekig ignorálta, s még olyan zseniális tudósok is, mint a Nobel-díjas Jacques Monod⁶, a nevüket adták általánosításokból eredő cáfolatok alapján íródott tanulmányokhoz, melyek a schoenheimeri elmélet képtelenségét, erővel hangsúlyozták⁷: *“Összegezve: nincs olyan bizonyíték, amely alátámasztaná, hogy az **emlős** sejtekben a fehérjék dinamikus egyensúlyban lennének. Kísérleteink szerint, a növekvő **E. coli** sejtekben a vizsgált fehérjék állandóak, statikusak, ezért szükségtelen feltételeznünk, hogy a fehérjéknek bármi közük is lenne a dinamikus állapothoz”*. Schoenheimer korai halála nem tántoríthatta el támogatóit; könyve⁸ (A fehérjék dinamikus állapota) nemzedékeket inspirált a téma folytatására, amely az intra- és extracelluláris proteolízis megismerésének kezdeti korszakát jelentette.

Az '50-es években a belga Christian de Duve felfedezte a lizoszómát⁹, s benne egy kizárólag savanyú körülmények között működő proteázt, a katepszin B-t. Párhuzamosan végzett, de független kísérleteknek¹⁰ köszönhetően, a kutatók végre előállhattak egy létező fizikai entitással, egy olyan sejtorganellummal, amely feltehetően az intracelluláris fehérjék bontásáért felelős. Tették ezt annak ellenére, hogy abban az időben még komoly problémát okozott a lizoszóma szubsztrát-felvételének és működésének pontos molekuláris értelmezése^{11,12}.

Megszületett tehát az intracelluláris fehérjebontás valódi dogmája, amely szerint a fehérjék minden kétséget kizáróan dinamikusan változó biomolekulák, melyek mennyisége a sejtben a szintézisük és a **lizoszómális** lebontásuk arányától függ.

Az ezt követő években számos, ellentmondásos kísérleti eredmény látott napvilágot, miszerint bizonyos proteolitikus jelenségek nem köthetők közvetlenül a lizoszómához. Szolgáljon bizonyítékul ez a néhány példa¹³: az intracelluláris fehérjék féléletideje különböző, 10 perctől akár 15 óráig is terjedhet; lizoszóma inhibitorok nagyon eltérő módon változtatták meg az egyes fehérjék féléletidejét, azt sugallva, hogy nem minden fehérjebontását a lizoszómális rendszer végzi; végezetül pedig egy termodinamikai paradoxon, miszerint számos fehérje lebontása energiaigényes folyamat^{14,15}, habár a lizoszóma proteázok működése, savas körülmények között exergonikus. Különböző elméletekkel próbálták magyarázni a fenti ellentmondásokat: pl. a féléletidő különbségek oka a szubsztrátok eltérő proteáz-érzékenysége lehet¹⁶; az energiaigény indirekt, a szubsztrátok lizoszómába juttatásához és a protonpumpa működéséhez, azaz a proteázok számára esszenciális alacsony intra-lizoszómális pH biztosításához kell¹⁷, ami történetesen igaz is.

Ezen a területen fontos áttörést jelentett Rabinovicz és Fisher szellemes kísérlete¹⁸, melyben megfigyelték, hogy retikulocitákban az abnormálisan feltekeredett és összeszerelődött hemoglobin gyorsan lebomlik. Minthogy a retikulociták terminálisan differenciálódott, lizoszómát már nem tartalmazó vörös vértestek, feltételezték, hogy a hibás fehérje lebontásáért valamilyen más, lizoszómától-független apparátus a felelős. Ezt Goldberg és Etlinger megfigyelése bizonyította. Kísérletükben retikulociták nyers, sejtmentes lizátuma szelektíven bontotta a hibás hemoglobint, amely folyamat kizárólag neutrális pH-n és ATP hidrolízise mellett ment végbe^{19,20}. Brian Pool és munkatársainak²¹ elegáns kísérletében az élő makrofágokhoz adott klorokvin (lizoszóma inhibitor) neutralizálva a lizoszóma pH-ját, inaktiválta a lizoszómális proteázokat, melynek hatására az extracelluláris fehérjék lebontása specifikusan gátlódott (lizoszóma szubsztrátok), míg az intracelluláris proteinek degradálódása folytatódott. A fenti megfigyelések bizonyítékot szolgáltatottak egy elemeiben (akkor) még csak alig ismert, komplex biokémiai folyamat, a lizoszómától-független, neutrális pH-n működő, ATP-függő intracelluláris proteolízis létre.

A fenti hipotézis első kézzelfogható bizonyítéka az volt, amikor kromatográfiás módszerekkel tisztítottak két ATP-függő proteolitikus faktort, az APF-1 és APF-2 fehérjéket²²⁻²⁵.

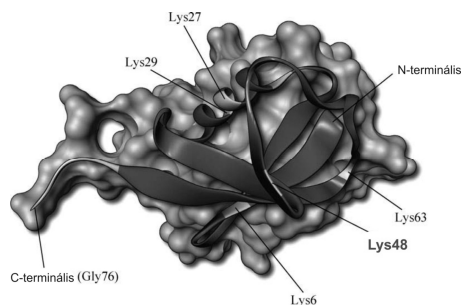
Az APF-1-ről hamar kiderült, hogy azonos az eukarióták birodalmában egységesen előforduló, kis hőstabil fehérjével, az ubiquitinnel²⁶. Mivel az ubiquitinről köztudott volt, hogy fehérjékhez kovalensen képes kötődni egy enzimkaskád segítségével²⁷, magát adta a feltételezés, miszerint az ubiquitinnel jelölt proteinek szubsztrátjaivá válnak egy ATP-függő degradációs apparátusnak. Nem kellett sokat várni az elmélet beigazolására. 1986-ban Hough²⁸ és munkatársai retikulocita lizátumból tisztítottak és jellemeztek egy „proteolitikus komplexet”, amelyről kiderült, hogy valójában két, egymáshoz nagyon hasonló intracelluláris proteáz, a 20S és 26S keveréke, és amely ATP jelenlétében képes volt bontani egy modellszubsztrátot, az ubiquitilált lizozimet²⁹.

Habár a '80-as évek végére már ismerték a jelölőt és a jelölést végző, valamint a jelet felismerő proteolitikus komplexet, hosszú időnek kellett eltelnie ahhoz, hogy egy egységes modellé szerveződjön össze a mára már ubiquitin-proteaszóma rendszernek nevezett, rendkívül összetett és sokoldalú biokémiai szisztéma. Ma már tudjuk, hogy az eukarióta szervezetekben a citoplazmatikus és nukleáris fehérjék 80-90%-a az ubiquitin-proteaszóma útvonal révén bomlik le. A rendszer két fő, esszenciális lépésből áll: az ubiquitin-ligáz enzimkaskádból, amely felismeri és poliubiquitilálja a lebontandó fehérjét, és a 26S proteaszómából, amely receptorai segítségével felismeri az ubiquitilált szubsztrátot és lebontja.

Az ubiquitin-ligáz enzimkaskád és az ubiquitin jel

A fehérjék poszttranszlációs modifikációja közismert jelenség. A dinamikus módosítások, mint amilyen az acetiláció vagy foszforiláció, reverzibilisen befolyásolhatják egy fehérje szerkezetét, interakciós partnereinek hálózatát és működését. Az utóbbi évtizedekben olyan kovalens módosításokat is azonosítottak, amelyek során egy kis fehérje specifikusan kapcsolódik a célfehérje valamely aminosavához (vagy egy másik módosító fehérjéhez), meghatározva ezzel annak sorsát. Ilyen módosító polipeptidek az ubiquitin és az ubiquitin-szerű (Ubl) fehérjék³⁰. Az ubiquitin (Ub) az eukarióták világában általánosan előforduló, hőstabil polipeptid³¹⁻³³. A mindössze 76 aminosavból álló, 8 kDa tömegű, konzervált globuláris fehérje (1. ábra), kulcseleme az energia-függő fehérjedegradációnak. Az ubiquitin legfontosabb elemei a 7 lizin (K) oldallánc³⁴ (K6, K11, K27, K29, K33, K48 és K63), melyekhez újabb ubiquitin és Ubl fehérjék kapcsolódhatnak izopeptid kötéssel, valamint a karboxi(C)-terminális -Arg-Gly-Gly76-COO⁻ motívum^{35,36}, amely egy exponált nyúlványként alkalmas a szubsztráthoz való kötődéshez.

Az ubiquitin más fehérjékkel fuzionálva szintetizálódik, és egy érési folyamat során vágódik le a prekurzorról. Élesztőben a négy ismert ubiquitin génből az *Ubr4* egy polifúziós több ubiquitint tartalmazó előfehérjét, míg az *Ubr1-3* riboszóma alegységhez kötött ubiquitin-riboszóma hibridfehérjét kódol. Az ubiquitint ubiquitin-specifikus C-terminális hidrolázok, más néven deubiquitilázok (DUBs) vágják le a előfehérjéről (processzálas)^{33,37}. Magasabbrendűekben a prekurzorok száma és mérete is nagyobb.

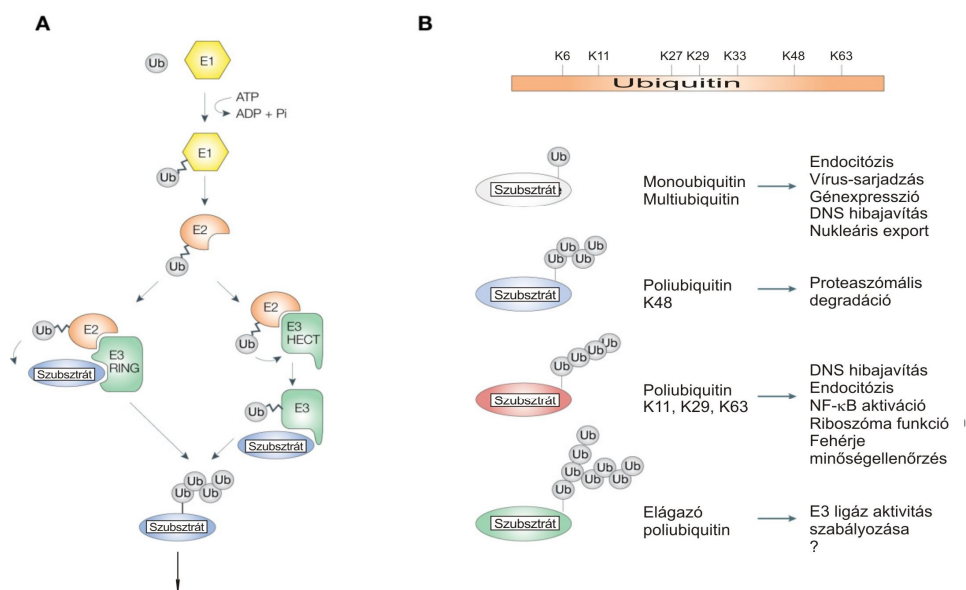


1. ábra. Az ubiquitin³⁸.

Röntgenkristallográfiás mérések alapján rekonstruált humán ubiquitin néhány kitüntetett lizin oldallánccal és az esszenciális C-terminális 76-os glicinnel.

Ma már tudjuk, hogy az ubiquitin a fehérjék poszt-szintetikus módosításának esszenciális eszköze. A szubsztráthoz az ubiquitin-ligáz enzimaszkád segítségével kapcsolódik. Affinitáskromatográfiát alkalmazva Hershko és munkatársai^{27,39} sikeresen tisztították és azonosították az ubiquitin-ligáz rendszer három különböző aktivitású enzimét (E1, E2 és E3), melyek jelenléte szükséges és elégséges volt az ubiquitin és egy vizsgált modellfehérje közti kovalens kötés kialakításához⁴⁰. A figyelem ezután az ubiquitilálódás biokémiai részleteinek megismerésére irányult⁴¹⁻⁴³. Az E1, vagy ubiquitin-aktiváló enzim (Uba1), amelyből fajonként egyet ismerünk (emlősökben kettőt), két aktív centrummal rendelkezik. Egyik feladata, hogy ATP és Mg^{2+} jelenlétében az ubiquitin karboxi-terminális 76. glicinjéhez (Gly76) AMP-t kapcsolva aktiválja az ubiquitint. Ezt követően a létrehozott ubiquitin-adenilát az enzim második katalitikus helyére kerül, ahol AMP kilépésével az enzim SH- csoportjának támadása következtében ubiquitin-tioészterré alakul. Az E2, vagy ubiquitin-konjugáló enzimek (Ubc) száma fajonként eltérő. Az E2 szintén két aktív hellyel rendelkező enzim, amely képes lehasítani az ubiquitint az E1-ről, majd egy transzészterifikációs reakcióban a második aktív centrumában található cisztein aminosavát használva tioészter-kötést létesíteni az aktivált ubiquitinnel (2A. ábra). Az E3, vagy ubiquitin-ligáz enzimek, melyek a rendszer szubsztrát specificitását biztosítják, rendkívül nagy számban fordulnak elő az eukarióta sejtben. Feladatuk (2A. ábra),

hogy kölcsönhatásba lépve az E2-ubiquitinnel és a lebontandó fehérjével, katalizálják az izopeptid kötés kialakulását a célfehérje valamely kitüntetett lizinének ϵ -aminocsoportja és az ubiquitin C-terminális Gly76 karboxil-csoportja között. Az E3 enzimek strukturálisan és funkcionálisan három csoportra oszthatók: 1. A HECT domént tartalmazó E3-ak aktív ciszteinje átveszi az ubiquitint az E2-ről és közvetlenül építi rá a szubsztrátra. 2. A RING fingert tartalmazók közvetetten juttatják át az ubiquitint a szubsztrátra, miközben nem alakítanak ki vele kovalens kötést. 3. A sok-alegységes E3-ligáz komplexek: SCF⁴⁴ és APC/C⁴⁵.



2. ábra. Az ubiquitin ligáz enzimkaskád és a különböző funkciójú ubiquitin jelek sematikus képe⁴⁶.

(A) Az ubiquitin ligáz enzimkaskád során, az E1, E2 és E3 enzimek segítségével az ubiquitin a szubsztrát fehérje lizinjéhez kapcsolódik izopeptid kötéssel. (B) A létrejött ubiquitin jel különböző lehet, ennek függvényében dől el a megjelölt fehérje további sorsa.

A szubsztrát felismerés mechanizmusa és specificitása kulcsfontosságú a sejt megfelelő homeosztázisának fenntartásához. Az E3 enzim specifikus szubsztrátját a sejt egy adott életpillanatában és/vagy kompartmentumában valamilyen konformációváltozás hatására bekövetkező, exponált helyzetbe kerülő degradációs jel (degron) segítségével ismeri fel, majd köti meg. Ma már elég részletesen ismerjük a különféle degronokat és azokat a „cseleket”, melyekkel a fehérjék rejtve tartják halálos ítéletüket, de azokat a mechanizmusokat is, amelyek a degradációs jelet előcsalogatva a fehérjéket elkerülhetetlen végzetükbe, a lebontásba kényszerítik. A legismertebb degronok⁴⁷: N-degronok (N-end rule: N-végi szabály), olyan N-terminális aminosavak, amelyek egy fehérje (pl. Scc1) féléletidejét drasztikusan lecsökkentik;

foszfodegronok, mint amilyen a PEST szekvencia, melynek foszforiláltsági állapota dönti el, hogy a fehérje (pl. CDK) degradálódhat-e vagy sem; destrukciós-kazetta, amely a sejtciklus szabályozóinak (pl. ciklinek) fajlagos degronja; oxigén-függő degron, amely normoxiás környezetben szolgáltat halál jelet (pl. HIF-1 α); hidrofób-, chito- és egyéb degradációs jelek. A szubsztrátspecifititás és felismerés mechanizmusa rendkívül összetett folyamat, ennek részletezésére itt nem térnek ki. Érdeemes megemlíteni azonban egy újonnan felfedezett enzimcsaládot, az E4-et, vagy ubiquitin-lánc elongációs faktorokat, amelyek kötődve az oligoubiquitin láncához elősegítik a megfelelő méretű poliubiquitin lánc összeszerelődését⁴⁸. Ma még keveset tudunk róluk.

Az ubiquitin jel: a szubsztráton kialakuló ubiquitiláció strukturálisan és funkcionálisan három csoportba sorolható^{46,49} (2B. ábra):

1. **Monoubiquitiláció** - egyetlen ubiquitin molekula kapcsolódik a célfehérje valamely lizinjére.
2. **Multiubiquitiláció** - a szubsztrátnak legalább két különböző lizinje monoubiquitilált.
3. **Oligoubiquitiláció** - egyetlen lizinhez legalább kettő (**di**-), de inkább négy vagy annál több (**poliubiquitiláció**) ubiquitin monomert tartalmazó folytonos vagy elágazó⁵⁰ lánc kapcsolódik.

Az E3 enzimek sokasága katalizálja a poliubiquitin láncok keletkezését is. Ilyenkor a szubsztrátra épült első ubiquitin valamely lizinjére egy újabb ubiquitin monomer épül, amely folyamat ciklusosan ismétlődve hozza létre a végleges láncot. A megjelölt fehérje sorsát illetően rendkívül fontos, hogy az oligoubiquitin láncban belül az ubiquitin egységek az előző ubiquitin tag melyik lizinjéhez (a hét közül) kapcsolódnak. Ennek megfelelően, ha a szubsztrátra épült első ubiquitin 48. lizinjéhez (K48) kötődik a következő ubiquitin monomer C-terminális glicinje, a keletkezett legalább négy monomerből álló poliubiquitin lánc (K48-as lánc) topológiai adottságainak köszönhetően általános degradációs szignálként⁵¹ fog értelmeződni a sejt számára. Ettől eltérően a K63-as poliubiquitin lánc (amikor az első ubiquitin 63-as lizinjéhez kapcsolódik a második ubiquitin) a DNS hibajavításban, szignál transzdukciós utakban és a receptor-irányított endocitózisban⁵², újabb adatok szerint pedig a fehérje minőségi kontrollban^{53,54} is (ERAD – endoplazmatikus retikulumhoz kapcsolt minőségellenőrzés) degradációs jelként⁵⁵ játszik szerepet. A K6-, K11-, K27-, K29- és K33-as lánc topológiájáról és biológiai relevanciájáról ma még keveset tudunk, valószínűleg a DNS hibajavításának folyamataiban^{46,56} játszanak szerepet (2B. ábra). A lánc sztereikus jellemzőit és a jel biológiai funkcióját tovább bonyolíthatja, ha a

láncon belül az ubiquitin monomerek többféle lizinen keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Ma már ismeretesek olyan hibrid láncok is, melyeket ubiquitin és ubiquitin-szerű fehérjék alkotnak. Az ubiquitin jelet ubiquitin receptorok ismerik fel és juttatják a megjelölt fehérjét a következő biokémiai lépés színhelyére. Ennek részleteivel egy későbbi fejezetben foglalkozom.

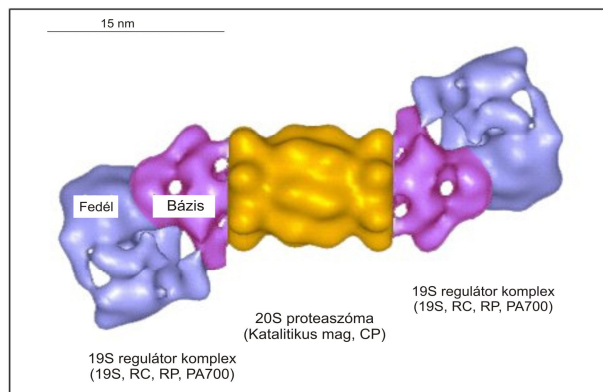
Az ubiquitiláció reverzibilis folyamat⁵⁷. Ahogyan az ubiquitin egy fehérjéhez kapcsolódhat, úgy le is vágódhat róla, melyet a sejt szabad, vagy fehérje komplexhez kapcsolt cisztein- és metalloproteázai, az ún. deubiquitilázok katalizálnak (DUB). A deubiquitilázok nem csak az ubiquitin érésének folyamatában, a prekursorok feldarabolásában játszanak szerepet, hanem fontosak az ubiquitin jel (pl. poliubiquitin lánc) eltávolításában és feldarabolásában is. A humán genom mintegy 95 lehetséges DUB enzimet kódol, amelyek hasonlóan az ubiquitin-ligázokhoz több, vagy csak néhány specifikus szubsztráton fejtik ki hatásukat⁵⁸.

A 26S proteaszóma

A 26S proteaszóma^{41,59-61} (3. ábra) az eukarióta sejtek ATP-függő proteolitikus komplexuma, amely kölcsönhatásba lépve az ubiquitin rendszerrel biokémiai folyamatok végkimenetelét szabályozza. Precíz, gyors, kvantitatív, proteolitikus és nem-proteolitikus működésének köszönhetően a legkülönbözőbb sejtéleti folyamatokban vesz részt^{62,63}: sejt-ciklus, apoptózis, szignál-transzdukció, DNS hibajavítás, immunválasz, transzkripció, metabolizmus, egyedfejlődési program, stb. Megtalálható a citoplazmában és a sejtmagban is⁶⁴.

A 26S proteaszóma egy szokatlanul nagy sejtalkotó, tömege a 26 Svedberg süllyedési állandónak megfelelően 2,5 MDa. ATP jelenlétében két alkomplexumból szerelődik össze⁶⁵: egy 700 kDa tömegű (20S proteaszóma) központi partikulumból (CP – central particle; catalytic core, proteolitikus mag), amelyhez mindkét végén egy-egy, 900 kDa tömegű (19S regulátor komplex), aktivátor, ún. regulátor partikulum (RC – regulatory complex) kapcsolódhat. Attól függően, hogy a 20S proteaszómához egy vagy két 19S regulátor komplex kapcsolódik, beszélhetünk egyszeresen- (RC-CP) vagy kétszeresen „sapkázott” (RP-CP-RP) 26S proteaszómáról⁶¹. A két konformációs forma elektroforetikus mobilitása ugyan különböző, de biológiai aktivitásuk azonos. Talán éppen ennek a flexibilitásnak köszönhetően a 26S proteaszóma alegység és alkomplex összetétele korántsem állandó. Habár külső és belső hatásokra (pl. γ -interferon \rightarrow immunoproteaszóma) a 20S partikulum alegységösszetétele is megváltozhat^{66,67}, sokkal

jellemzőbb strukturális változás a 20S terminálisaihoz kapcsolódó, különböző aktivátor komplexumok kombinálódása, amely hibrid proteaszómák megjelenéséhez, azaz eltérő funkcionális egységek létrejöttéhez vezet⁵⁷.



3. ábra. A 26S proteaszóma holoenzim 3D modellje.

A 26S proteaszóma egy központi 20S proteaszómából és egy- vagy két 19S regulátor komplexből szerelődik össze.

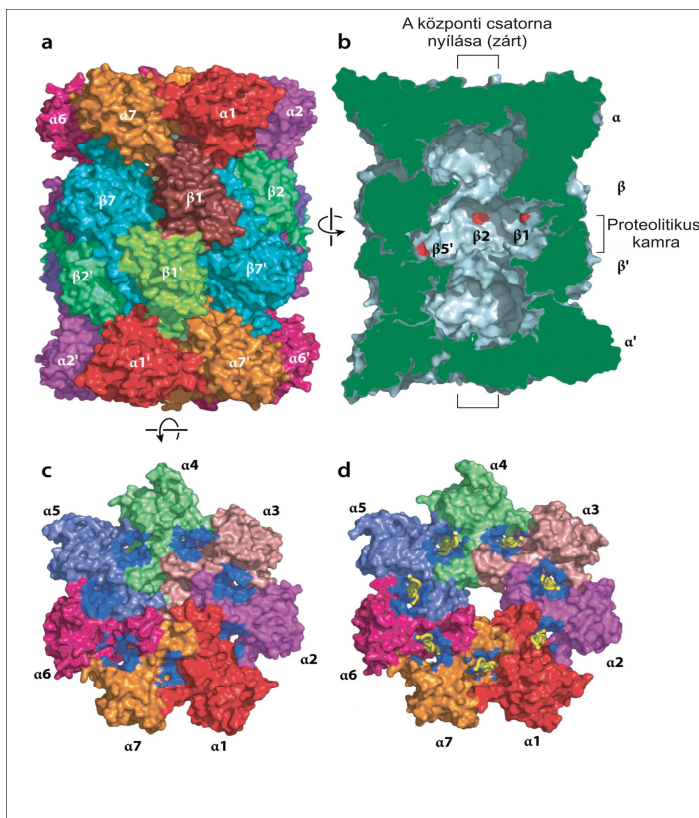
Korábban úgy hitték, hogy a 26S proteaszóma aktivitása kizárólag poliubiquitilált fehérjék lebontására korlátozódik. Az első megismert kivétel az ornitin-dekarboxiláz⁶⁸ volt, amely fehérjét inhibitorának (antizyme) jelenlétében, ubiquitilálatlanul is a 26S proteaszóma ismeri fel és bontja le. Később kiderült, hogy számos, úgynevezett rendezetlen szerkezetű elemet hordozó fehérje^{69,70} is ubiquitilálatlanul a 20S proteaszóma szubsztrátjává válhat⁷¹. Ebben a folyamatban a célfehérje (pl. p53, p73) rendezetlen szerkezetű része a szabad 20S proteaszóma katalitikus magjába kerül, és ott lebomlik. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer működését tovább bonyolítja a proteaszóma inhibitorok és kölcsönható fehérjék (PIPs – proteasome interacting proteins) sokasága⁷² is, melyek hatásmechanizmusainak megismerése számos esetben kínált eszközt a humán klinikum számára, alattomos betegségek kezelésében⁷³.

Habár a 26S proteaszóma rendszer sok tekintetben konzervált az eukarióta birodalomban, funkcionális és strukturális különbségekkel is találkozhatunk a vizsgált fajok között. Míg az élesztő 26S proteaszóma összeszerelődése⁶³, interaktómája^{74,75} és receptorainak működése⁷⁶, valamint génjeinek koordinált szabályozása és kifejeződése⁷⁷ jól ismert, addig szinte alig tudunk valamit a magasabbrendű eukariótákban (lúdfű, *Drosophila*, egér, ember) lejátszódó hasonló folyamatokról.

A 20S proteaszóma

Az első fontos megfigyelést ezzel a partikulummal kapcsolatban Harris és munkatársai tették 1968-ban⁷⁸. Humán eritrociták lizátumának vizsgálatakor egy cylinder formájú testecskét láttak az elektromikroszkóp képernyőjén. A cilindrinnek elnevezett struktúrát később más fajokban is kimutatták⁷⁹. 1988-ban megállapítást nyert⁸⁰, hogy a cilindrin egy 11x15 nm-es, hordó alakú, több alegységes proteáz komplex. Ekkor nyeri el a 20S proteaszóma nevet, utalva proteolitikus aktivitására és összetett felépítésére. Hosszú évekig a 20S proteaszómát eukarióta sajátosságnak tartották, mígnem 1989-ben először egy archebaktériumból, a *Thermoplasma acidophilum*ból⁸¹, majd 1995-ben egy eubaktériumból a *Rhodococcus erythropolis*ből⁸² szerkezetében és aktivitásában is hasonló komplexet sikerült kimutatni. Ma már tudjuk, hogy a 20S proteaszóma általánosan előfordul az élővilágban⁸³, az eukariótáknál bonyolultabb összetételű és esszenciális, míg prokariótáknál csupán a stressztűrés szempontjából jelent evolúciós előnyt, de hiánya nem letális.

A 20S proteaszóma pro- és eukariótákban egyaránt 28 alegységből áll⁶⁰. A 14 α és 14 β alegység 4 gyűrűt formálva hozza létre a hordó alakú struktúrát (4. ábra). A gyűrűk prokariótákban 7-7 azonos, eukariótákban pedig 7-7 különböző α - és β -alegységből szerelődnek össze melyből 1-1 α -gyűrű a hordó végein, míg a két β -gyűrű internálisan helyezkedik el. A gyűrűk és a 20S partikulum összeszerelődése rendkívül bonyolult és sokszereplős folyamat, melynek molekuláris részleteit ma már jól ismerjük^{63,84,85}. Kristályszerkezeti vizsgálatokból tudjuk, hogy az $\alpha_1\text{-}\beta_1\text{-}\beta_1\text{-}\beta_1\text{-}\alpha_1\text{-}\beta_1$ (prokariótáknál: $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$) konformáció eredményeként három, keskeny csatornával összekötött, ún. nanokompartment alakul ki a komplexen belül (4B. ábra). A centrális vagy proteolitikus kamrát a β -gyűrűk alkotják, melyek β_1 , β_2 és β_5 alegységei felelősek a 20S proteaszóma központi kamrájának belső felszínén kialakult háromféle hidroláz aktivitásért^{86,87}: kimotripszin-, tripszin- és kaszpázszerű. Gerinceseknél 4 további β -alegységet ismerünk: három, γ -interferon indukálta immuno- (β_{1i} , β_{2i} és β_{5i}), és egy thimus-specifikus (β_{5t}) alegységet, melyek a 20S proteaszóma központi kamrájában a megfelelő alegységek helyére épülve létrehozzák az immuno- és a thimoproteaszóma altípusokat⁸⁸. Az immunoproteaszóma az antigéngyártásban, míg a thimoproteaszóma a csecsemőmirigy egyedi peptidkészletének létrehozásában vesz részt^{66,67}. A 20S proteaszóma centrális kamráját határoló két elő-kamra szerepe ma még nem ismert.



4. ábra. Az eukarióta 20S proteaszóma oldal- és felülnézetből⁷⁶.

(A) A hordó alakú 20S proteaszóma oldalnézetből: középen a két β -, terminálisan pedig a két α -heteroheptamer gyűrűvel. (B) A zárt 20S proteaszóma hosszanti keresztmetszete: a két oldalkamra és a $\beta 1$, $\beta 2$ és $\beta 5'$ alegységek alkotta proteolitikus hely a középső kamrában. A kamrákat egy keskeny központi csatorna köti össze, melynek két vége alapállapotban zárt. (C) A 20S proteaszóma α -gyűrűje felülnézetből, zárt állapotban: a kötősebek (kék) üresek, a nyílás zárt. (D) A 20S proteaszóma α -gyűrűje felülnézetből, nyitott állapotban: a kötősebekbe (kék) illeszkedett HbYX motívumok (sárga) a centrális csatorna nyitódásához vezetnek.

Habár a 20S partikulum szerkezete nagyon hasonló az archeobaktériumoktól az élesztőn át az emberig, mégis fontos strukturális és egyben működésbeli különbség mutatható ki a prokarióták és az eukarióták komplexe között. A *Termoplasma acidophilum* archeánál 1.5 nm-es, keskeny nyílás fedezhető fel a 20S proteaszóma két végén, melyek a kamrákat összekötő központi csatorna kimeneti nyílásai – a partikulum két vége tehát nyitott. *Saccharomyces cerevisiae*-nél és magasabbrendű eukariótáknál a heteroheptamer α -gyűrűk alegységeinek megnyúlt N-terminálisai lezárják a központi csatorna kimeneti nyílásait⁸⁹ (4C. ábra) – ennek köszönhetően a 20S proteaszóma alapállapotban inaktív. Eukariótákban a heteroheptamer α -gyűrűk kötősebeihez kapcsolódnak az ún. aktivátor komplexek⁵⁷, amelyek ATP-hidrolízise mellett konformációs változást generálva az N-terminális nyúlványokban elősegítik a kapu nyitódását, szabad utat biztosítva az addigra már előkészített, lebontandó szubsztrát bejutásának.

A 20S proteaszóma és a legismertebb aktivátor komplexuma (19S regulátor) együttesen alkotják az előző fejezetben bemutatott 26S proteaszómát. A 20S partikulum lezárása és a regulátor komplexek megjelenése lehetővé tette az eukarióta sejt számára egy összetettebb, specifikusabb és finomabban hangolt fehérjelebontási rendszer kialakítását és alkalmazását.

A 19S regulátor komplex

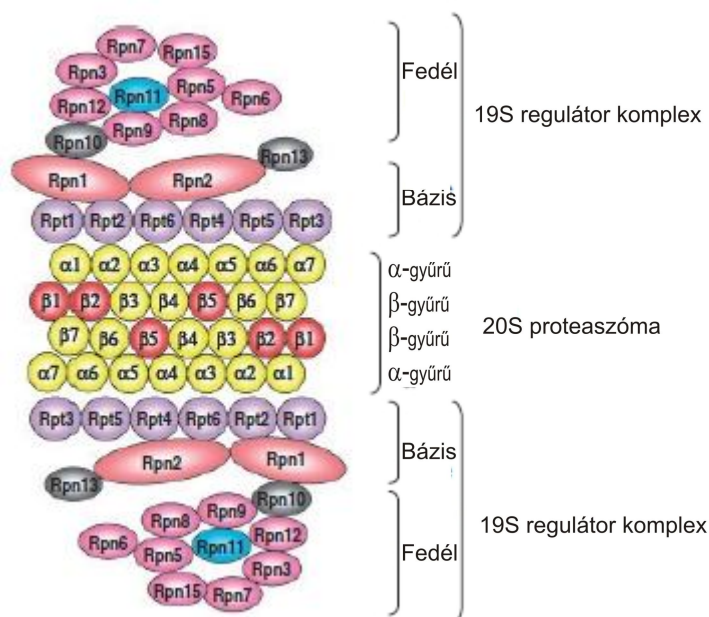
Jelenleg számos aktivátor komplexum ismeretes (PA28, PA700, PA200, stb.), amelyek a 20S proteaszóma terminálisaival kapcsolódva (5. ábra) különféle funkciójú 26S proteaszóma formációkat hoznak létre⁵⁷. Ezek közül a legáltalánosabb a 19S regulátor komplex.

A '80-es évek végén kiderült, hogy a Hough és munkatársai²⁸ által tisztított „proteolitikus komplex”, amely kizárólag poliubiquitilált fehérjéket bont, 20S proteaszómából és egy ismeretlen komponensből szerelődik össze ATP jelenlétében⁹⁰. Az ismeretlen partikulumot 1992-ben retikulocita lizátumból tisztították és azonosították⁹¹. Hamar kiderült, hogy ez a komplex ATP és 20S proteaszóma jelenlétében aktív 26S proteaszóma holoenzimet képes létrehozni. Az elsők között 1993-ban Udvardy Andor⁹² homogenitásig tisztított egy többalegységes komplexumot *Drosophila* embriók extraktumából. A μ partikulumnak elnevezett egységről, amely önmagában nem rendelkezett peptidáz aktivitással, bizonyította, hogy ATP jelenlétében képes beépülni egy sokkal nagyobb, 1500 kDa-os multiprotein komplexumba, amely már szelektíven bontotta az poliubiquitilált fehérjéket. Mindezen kritériumoknak megfelelően kiderült, hogy a μ partikulum, mint esszenciális aktivátor egység, sztöchiometrikus komplexet képezve a 20S proteaszómával alkotja a muslica 26S proteaszómát. Később, szedimentációs tulajdonságainak megfelelően a 20S proteaszóma szabályozásában szerepet játszó 26S proteaszóma másik alkomplexumát 19S sapkának, valamint PA700, 19S regulátor komplexnek és 19S regulátor partikulumnak (RP/RC – regulatory particle/complex) nevezték el⁹³.

Elektromikroszkópos és biokémiai kísérletek alapján ma már tudjuk, hogy egy proteolitikusan aktív 26S proteaszóma a 20S proteaszóma központi, katalitikus magból és az ehhez terminálisan kapcsolódó egy vagy két 19S regulátor komplexből szerelődik össze^{57,63,84}. A sokalegységes 19S regulátor komplex felelős a poliubiquitilált szubsztrátok közvetett és közvetlen felismeréséért és megkötéséért. Deubiquitiláló aktivitása a lebontandó fehérjéhez kapcsolódott poliubiquitin lánc eltávolításáért felelős, amely az ubiquitin monomerek citoplazmatikus visszatáplálásához vezet. Anti-chaperon tulajdonságainak köszönhetően képes letekerni a szubsztrátot, kinyitni a 20S proteaszóma kapuját, és bepumpálni a lebontandó fehérjét a katalitikus mag keskeny csatornáján keresztül a proteolitikus kamrába. Mindezt komplexbe szerveződött, különböző aktivitású és összetételű alegységeinek köszönheti.

Míg a 20S proteaszóma összetétele és működése azonos az eukarióták birodalmában, addig a 19S regulátor komplex szerveződésében és működési mechanizmusában lehetnek eltérések az egyes fajok között^{94,95}. A regulátor komplex általában 19-20 alegységből áll, amelyek két funkcionális csoportba sorolhatók: az ATPáz doménnel rendelkező Rpt-alegységek (Regulatory Particle of triple-ATPase subunits; Regulátor Partikulum tripla-ATPáz alegységek) és az ATPáz domén nélküli Rpn-alegységek (Regulatory Particle non-ATPase subunits; Regulátor partikulum nem-ATPáz alegységek). *Drosophilában*^{95,96} (és borjában⁶⁵) az alegységeket molekulatömegüknek (42-110 kDa) megfelelően nevezték el (1. táblázat).

A regulátor komplex só kezelés hatására két jól elkülöníthető funkcionális egységre, alkomplexumra bontható^{97,98}: a legalább 9 Rpn-alegységet tartalmazó fedélre és a 4 Rpn és 6 Rpt alegységből összeálló bázisra (5. ábra). A bázis létesít kapcsolatot a 20S proteaszóma α -gyűrűinek kötőzsebével, míg a fedél a bázishoz kapcsolódva végzi biológiai funkcióját.



5. ábra. Az élesztő 26S proteaszóma komplexumainak alegységösszetétele⁵⁷.

Az élesztő 26S proteaszóma 20S komplexumát 28 alegység alkotja, melyek közül a **β1**, **β2** és **β5** felelősek a katalitikus aktivitásért. A 19S regulátor komplex a bázis és fedél alkomplexumokból szerelődik össze és összesen 19-20 alegységből áll.

A fedél alkomplexum:

A fedél legalább kilenc nem-ATPáz alegységből tevődik össze (Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11, Rpn12 és Rpn15), melyek pontos funkciója alig ismert. A legfontosabb feladata a lebontandó szubsztrát deubiquitilálása, melyet élesztőben az Rpn11 metalloproteáz végez^{99,100}. Az Rpn11/S11/p37B (élesztő/ember/ *Drosophila*) Zn²⁺ ionok jelenlétében levágja a poliubiquitin láncot a lebontandó fehérjéről. A lehasított poliubiquitin láncot ezután független, citoplazmatikus deubiquitilázok (DUB) darabolják fel ubiquitin monomerekké. A magasabbrendű eukarióták regulátor komplexuma további DUB-okat is tartalmazhat. Ilyen enzim pl. az ubiquitin C-terminális hidrolázok¹⁰¹ családjába tartozó p37A/Uch37 (*Drosophila*/ember)⁹⁵, amely az Rpn11/S11/p37B-hez hasonlóan a poliubiquitin lánc eltávolításában játszik szerepet. A fedél többi alegységének funkciójáról csak keveset tudunk. Az Rpn3, 5, 6, 7, 9 és 12 alegységek a PCI komplexumokban is kimutatható⁹⁷ ún. PCI motívumot hordoznak¹⁰². Ez a motívum nem rendelkezik semmilyen ismert katalitikus aktivitással, szerepe a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában van. Mai elképzelésünk szerint az alegységek közti PCI-PCI interakciók a fedél stabilitásában játszanak szerepet, ami a 19S regulátor komplex megfelelő működését segíti elő.

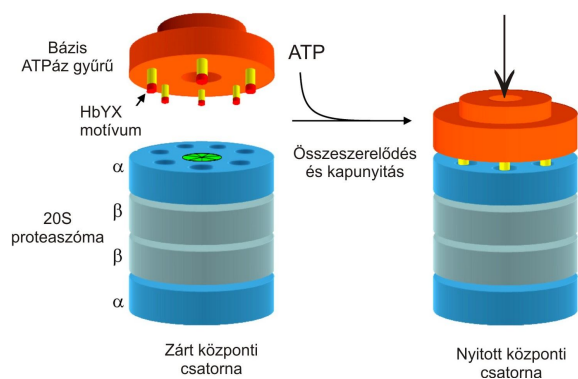
	Élesztő	<i>Drosophila</i>	Ember
1	Rpt 1	p48B	S7
2	Rpt 2	p56	S4
3	Rpt 3	p48A	S6
4	Rpt 4	p42D	S10b
5	Rpt 5	p50	S6'
6	Rpt 6	p42C	S8
7	Rpn 1	p97	S2
8	Rpn 2	p110	S1
9	Rpn 10	p54	S5a
10	Rpn13	p42E	ADRM1
11	Rpn 3	p58	S3
12	Rpn 5	p55	S5b
13	Rpn 6	p42B	S9
14	Rpn 7	p42A	S10
15	Rpn 8	p39B	S12
16	Rpn 9	p39A	S11
17	Rpn 11	p37B	S13
18	Rpn12	p30	S14
19	Rpn15	CG13779	?
20	<u>Yuh1</u>	<u>p37A</u>	<u>Uch37</u>

1. táblázat. Az 19S regulátor komplex alegységei.

Az élesztő 19S regulátor komplex alegységeinek ortológjai *Drosophilában* és emberben (**bázis**, fedél és egy feltételezett **DUB**).

A bázis alkomplexum.

A bázist hat paralóg AAA ATPáz-ból (Rpt1-Rpt6) álló heterohexamer gyűrű és négy nem ATPáz alegység (Rpn1, Rpn2, Rpn10 és Rpn13) alkotja (5. ábra). Az ATPázok alkotta gyűrű képezi a kapcsolatot a 19S regulátor komplex és a 20S proteaszóma külső gyűrűje között^{103,104}. Az ATPáz alegységek három aminosavas C-terminális **HbYX** (Hb-hidrofób, Y-tirozin, X-bármilyen aminosav) fehérjemotívumai beleilleszkednek a 20S partikulum α -gyűrűinek kötőzsebeibe (6. ábra), majd az ATP hidrolíziséből származó energia felhasználásával konformációváltozást generálva az α -alegységek N-terminális nyúlványaiban képesek kinyitni a 20S proteaszóma zárt kapuját¹⁰⁵. Ez a folyamat teszi lehetővé a szubsztrát bejutását a katalitikus mag központi kamrájába. Az ATPáz gyűrűnek kiemelkedő szerepe van a deubiquitilált szubsztrátok letékerésében, valamint a 26S proteaszóma ATP-függő, dajkafehérje-segített összeszerelődésében is. Így bármelyik Rpt-alegység deléciója a fenti folyamatok teljes megszűnéséhez és a 26S proteaszóma inaktiválódásához vezet^{106,107}.



6. Ábra. A regulátor komplex és a 20S proteaszóma csatlakozási modellje – kapunyitás¹⁰⁸.

A regulátor komplex bázisát (**piros**) alkotó ATPáz alegységek C-terminális **HbYX** motívumai ATP jelenlétében beilleszkednek a 20S proteaszóma α -gyűrűjének (**sötétkék**) kötőzsebeibe, konformációváltozást generálnak az α -alegységek N-terminálisában, ami a zárt központi csatorna nyitódását idézi elő.

A bázis nem-ATPáz alegységei közül a nagy mólsúlyú Rpn1/p97 (élesztő/*Drosophila*) és Rpn2/p110 úgynevezett váz fehérjék, míg a kisebb Rpn10/p54 és az Rpn13/p42E a proteaszóma saját poliubiquitin receptor alegységei. Az Rpn1/2 komplex nagy méretének és különleges szerkezetének köszönhetően hamar a regulátor komplex funkcionális vizsgálatának célpontjává vált. Speciális struktúráját a 30-40 aminosavból szerveződő 11 tandem ismétlődő hajtű motívum biztosítja¹⁰⁹. Az Rpn1/2 komplex így egy centrális csatornával rendelkező tekerccsé alakul¹¹⁰,

melynek hatalmas kötési felszíne teszi lehetővé a bázis központi egységének is nevezett komplex kialakulását és működését. Váz fehérjeként az Rpn1/2 komplex elsődleges funkciója, hogy kapcsolatot létesítsen a bázis ATPáz gyűrűje és a fedél között, stabilizálja a 19S regulátor komplexumot, és dokkolási felszín biztosítson további alegységek (Rpn10 és Rpn13), sőt proteaszómával kölcsönható fehérjék számára is (5. ábra). Ezek közül a legfontosabbak a szubsztrátokat szállító szabad, ún. UBA/UBL poliubiquitin receptorok¹¹¹, melyek élesztőben közvetlenül, magasabbrendűekben pedig közvetetten¹¹² az Rpn1-hez kapcsolódnak. Az Rpn1/2 elemhez különféle aktivitású enzimek is kötődhetnek, melyek közül az Ubp6 deubiquitiláz az Rpn1-hez¹¹³, míg a Hul5 ubiquitin ligáz az Rpn2-höz¹¹⁴ képes dokkolni.

Az Rpn1/2 szerveződésével és működésével, valamint a poliubiquitin receptorok dokkolási modelljével kapcsolatban számos ellentmondásba ütközhetünk a korai irodalmat olvasva. Ennek okát ma már világosan látjuk: az élesztőben megismert poliubiquitilált fehérje felismerési és szállítási modell nem alkalmazható minden esetben a magasabbrendű eukariótákra. A különbség a poliubiquitin receptorok szerkezetében, valamint a szubsztrát szállítás eltérő mechanizmusában keresendő, melynek részleteivel a következő fejezetben ismerkedhetünk meg.

A poliubiquitin receptorok

Az ubiquitin-ligáz enzimkaszád során létrejött poliubiquitilált fehérjéket a poliubiquitin receptorok ismerik fel, kötik meg és szállítják a 26S proteaszómához. Az öt legismertebb poliubiquitin receptorból kettő, az Rpn10/p54 és az Rpn13/p42E a 26S proteaszóma alegységei⁷⁶, míg három, a Rad23, Dsk2 és Ddi1 a proteaszómától független, ingázó faktorok¹¹⁵. *In vitro* keresztkötéses kísérletekben újabb lehetséges proteaszómális ubiquitin receptorokat azonosítottak (Rpt5, Rpt1 és Rpn1), de ezek biológiai jelentőségét nem sikerült igazolni^{116,117}. A poliubiquitin receptorok működésével és strukturális felépítésével kapcsolatos ismeretanyag gyakorlatilag az élesztő fajokban végzett kísérleti eredményekre korlátozódik. Az utóbbi években elvégzett *Drosophila*, egér, humán-sejtes és növényi kísérletek ugyan nagyfokú konzerváltságot mutattak a receptorok alapvető szerkezetével és működésével kapcsolatban, de számos számbeli és strukturális különbségre is felhívták a figyelmünket. Ma nem találunk egyetlen egy közleményt sem, amely egy magasabbrendű eukarióta poliubiquitin receptorainak átfogó vizsgálatával foglalkozna – pedig igény lenne rá.

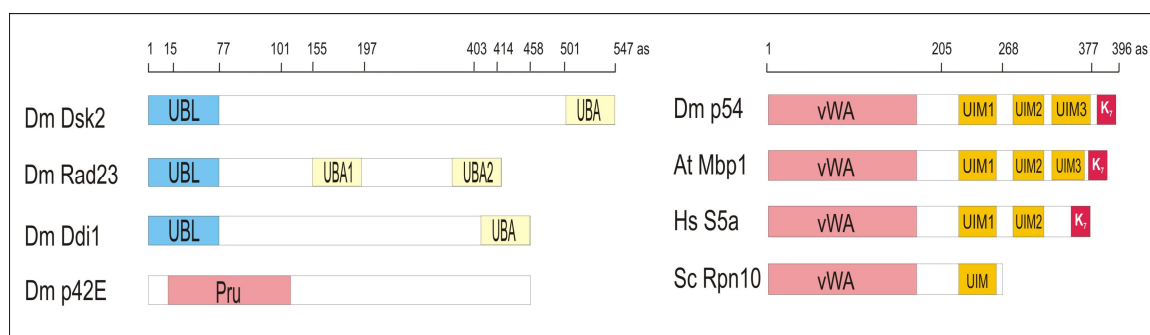
I. Rpn10/S5a/p54.

Az első receptor, amelyről kiderült, hogy poliubiquitilált fehérjéket nagy affinitással képes kötni, a humán 26S proteasóma S5a alegysége volt¹¹⁸. Ortológjait, a p54-et *Drosophilában*¹¹⁹, az Mbp1-et lúdfüben¹²⁰, majd az Rpn10-et élesztőben¹²¹ hamar megtalálták, így lehetőség nyílt a receptor részletes biokémiai és fiziológiai vizsgálatára különböző fajokban. Kiderült, hogy az Rpn10/S5a/p54 (élesztő/humán/*Drosophila*) a legalább négy ubiquitin monomerből álló, K48-as poliubiquitin láncot képes felismerni és megkötni.

Az Rpn10/S5a/p54 két funkcionálisan és strukturálisan is különböző egységre osztható (7. ábra). A fehérje N-terminális része hordozza az evolúciósan konzervált von Willebrand-A (vWA) faktorra jellemző domént⁹⁷, amely a proteasóma regulátor komplexének bázisához történő kapcsolódáshoz, valamint a bázis-fedél közötti stabil kapcsolat elősegítéséhez szükséges¹²². A fehérje talán legizgalmasabb, de egyben legvitatottabb strukturális egysége a C-terminális fele, amely az ubiquitin kötéseért felelős ubiquitin-interakciós motívumokat (UIM) hordozza¹²³⁻¹²⁵. Az egyetlen α -hélixből álló UIM^{76,126} az ubiquitin sekély, hidrofób árkába illeszkedve¹²⁷ képes az ubiquitinnel interakcióba lépni (8A. ábra). Habár az UIM-ok kis affinitással a monoubiquitint is kötik¹²⁸, fő funkciójuk a poliubiquitilált-, és legújabb eredmények szerint az ubiquitin-szerű doménnel rendelkező fehérjék összegyűjtése (9. ábra). Az Rpn10/S5a/p54 ugyan több mono - és poliubiquitilációra is alkalmas lizin aminosavat tartalmaz^{114,129}, a magasabbrendűek S5a/p54 C-terminálisán található konzervált lizinek szerepéről ma még keveset tudunk.

Az a megfigyelés, miszerint az élesztő Rpn10¹³⁰ és a muslica p54⁹⁸ képes leválni a proteasómáról, majd reasszociálni, az Rpn10/S5a/p54 ideiglenes extraproteasómális funkciójának lehetőségére mutat rá (ingázó elmélet). *In vitro* kísérleti rendszerben a *Drosophila* proteasóma p54 alegysége Zn^{2+} ionok hatására leválik a komplexumról, amit a proteasóma alkompexumaira történő reverzibilis szétesése és teljes inaktiválódása követ⁹⁸. Extraproteasómális tartózkodása során a p54 kölcsönhatásba lép a SUMOilációban szerepet játszó Smt3 SUMO aktiváló és az Ubc9 SUMO konjugáló fehérjemódosító enzimekkel. A SUMO¹³¹ (Small ubiquitin-like modifier) a proteinek lizinjeihez kovalensen kötődő ubiquitin-szerű fehérje. Hatására a módosított fehérje funkciója és lokalizációja változik meg. Az a tény, hogy a p54 N-terminális kölcsönhatásba lép fehérjemodifikációban résztvevő enzimekkel felveti annak lehetőségét, hogy a disszociációt követően (vagy azt megelőzően) a p54 valamilyen

poszttranszlációs módosításon megy keresztül. Ma úgy gondoljuk, hogy a konzervált terminális lizinek mono/oligoubiquitilációja¹³², más körülményekkel (pl. ionok hatása, SUMOizáció, stb.) közrejárva szükséges az S5a/p54 proteasómáról történő leválásához és/vagy extraproteasómális funkcióinak végrehajtásához. Az Rpn10/S5a/p54 ingázás elmélete mellett szól, hogy kis mennyiségű szabad Rpn10/S5a/p54 permanensen kimutatható a proteasómától független fehérjefrakciókban^{119,121} muslicában (14A. ábra) és élesztőben egyaránt.



7. ábra. A poliubiquitin receptorok sematikus képe.

Az UBA/UBL poliubiquitin receptorok (Rad23, Dsk2 és Ddi1) nagyfokú szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutatnak az eukarióták birodalmában. UBL doménjükkel (UBL – ubiquitin-szerű) a proteasómához kapcsolódnak, míg UBA doménjükkel (UBA – ubiquitinnel asszociáló) a szubsztrátokat kötik meg. Az Rpn13/p42E Pru-doménjével köti a szubsztrátokat. Az Rpn10/S5a/p54/Mbp1 a proteasómához vWA doménjével (vWA – von Willebrand-A) dokkol, míg a szubsztrátokat UIM motívuma köti meg (UIM – ubiquitin interakciós motívum), amelyből az élesztő Rpn10 egyet, a humán S5a kettőt, míg a lúdfü Mbp1 és *Drosophila* p54 hármat hordoz. K₇ – konzervált terminális lizinek.

Az Rpn10/S5a/p54 C-terminálisának hossza, konzervált lizinjeinek és UIM-ainak száma fajonként változó (7. ábra). Az Rpn10, amely nem esszenciális alegysége az élesztő 26S proteasómának, mindössze 268 aminosavból áll, s egyetlen UIM-ot és terminális lizint hordoz. A magasabbrendű eukarióták Rpn10 ortológjainak (Mbp1, p54, S5a és az egér Rpn10) C-terminálisa hosszabb, több UIM-ot és pontosan hét konzervált, terminális lizint tartalmaz. Szemben az élesztő Rpn10-zel, az egér Rpn10 és a muslica p54 esszenciális alegységei a 26S proteasómának^{133,134}. A 377 aminosav hosszú humán S5a az élesztő Rpn10 UIM-ával azonos ún. UIM1-gyel, és ezen kívül egy második, eltérő összetételű UIM2-vel is rendelkezik, melyek közül az UIM2-t alternatív splicing-gal, az egyedfejlődés különböző szakaszaiban elveszíti¹³⁵. A 396 aminosavat tartalmazó *Drosophila* p54 az alap UIM-on kívül további két, egymástól független UIM-ot hordoz, az UIM2-t és UIM3-at¹³⁶. Azt, hogy pontosan mi a szerepe az extra

UIM-oknak a magasabbrendű eukariótákban, ma még nem teljesen ismerjük. Tudjuk például, hogy az UIM2 5x erősebben köti^{125,137} a monoubiquitint, mint az UIM1, de ha poliubiquitin lánc kerül a közelükbe, akkor az UIM1 és UIM2 többé nem kompetál, hanem kooperál egymással a szubsztrát minél hatékonyabb megkötése érdekében⁷⁶.

1996-ban egy hosszú tudományos vita kezdetét jelentette, mikor kiderült, hogy élesztőben az *Rpn10* deléciója nem letális¹²¹, sőt a vad típustól csak minimális mértékben eltérő fenotípus jellemző az *Rpn10* hiányában (pl. megnő a stressz érzékenység). Magasabbrendű eukarióták *Rpn10* ortológjainak genetikai analízise teljesen más eredményt mutatott. *Arabidopsis*-ban az *rpn10* mutánsra jellemző volt a csökkent csírázási képesség, gyengébb növekedés és a csökkent mitotikus index¹³⁸. *Drosophilá*-ban a p54-et kódoló *Pros54* deléciója¹³³ polifázisos letalitást okozott, amit a poliubiquitilált fehérjék és a 26S proteaszóma alegységek (a proteaszóma gének koordinált szabályozása miatt) drasztikus felszaporodása előzött meg. Egérben az *Rpn10* mutációja pedig embriókori letalitáshoz vezetett¹³⁴. Mivel a *Arpn10* élesztő mutánsokban nem halmozódott fel az poliubiquitilált fehérjék (és mivel a vezető laboratóriumok modellszervezete az élesztő volt), kétségek merültek fel az *Rpn10*-zel, mint poliubiquitin receptor aktivitással ténylegesen rendelkező fehérjével szemben. Viszont ez a megfigyelés és kételkedés további lehetséges poliubiquitin receptorok felkutatásához vezetett.

A poliubiquitilált fehérjék nagyfokú akkumulálódása a *Arad23* és *Adsk2* élesztő mutánsokban arra utalt, hogy a Rad23 és Dsk2, a két proteaszómától független fehérje a fő poliubiquitin receptorai az élesztő sejtekben¹¹⁵, míg az *Rpn10* csak egy jelentéktelen, kisegítő faktor lehet. Az elméletet cáfolta az a megfigyelés, miszerint a *Arad23Arpn10* kettős deléciós mutánsban a poliubiquitilált fehérjék felhalmozódása, valamint a mutánsok kanavanin (aminosav analóg) érzékenysége 100x nagyobb volt, mint az egyszeres deléciós mutánsokban¹³⁹. A *Arad23* és *Arpn10* egyszeres és kettős deléciós mutánsokból preparált 26S proteaszóma nem tudta bontani a hozzá adott modellszubsztrátot¹⁴⁰, a poliubiquitilált Sic1-et (pUb-Sic1). Rekombináns *Rpn10* hozzáadásával a *Arpn10*-ből tisztított 26S proteaszóma aktivitása újra beindult, és a pUb-Sic1 lebomlott. Ezzel szemben a *Arad23* mutánsból nyert 26S proteaszóma csak rekombináns Rad23 és *Rpn10* együttes alkalmazása mellett tudta bontani a pUb-Sic1-et. A fenti kísérletek tehát világossá tették, hogy az eukarióta sejtekben az *Rpn10* és a szabad poliubiquitin receptorok **kölcsönhatása** nélkülözhetetlen az ubiquitilált fehérjék összegyűjtésében, szállításában és

lebontásában. A vita konklúziója fontos lecke volt az „élesztősöknek”, mert felhívta a figyelmet az ubiquitin-proteaszóma rendszer evolúciós különbségeire és a szubsztrátfelismerő receptorok hasonló, de mégis különböző voltára, de hasznos volt a „magasabbrendű eukariótásoknak” is, hiszen így újabb típusú poliubiquitin receptorokat ismerhettek meg.

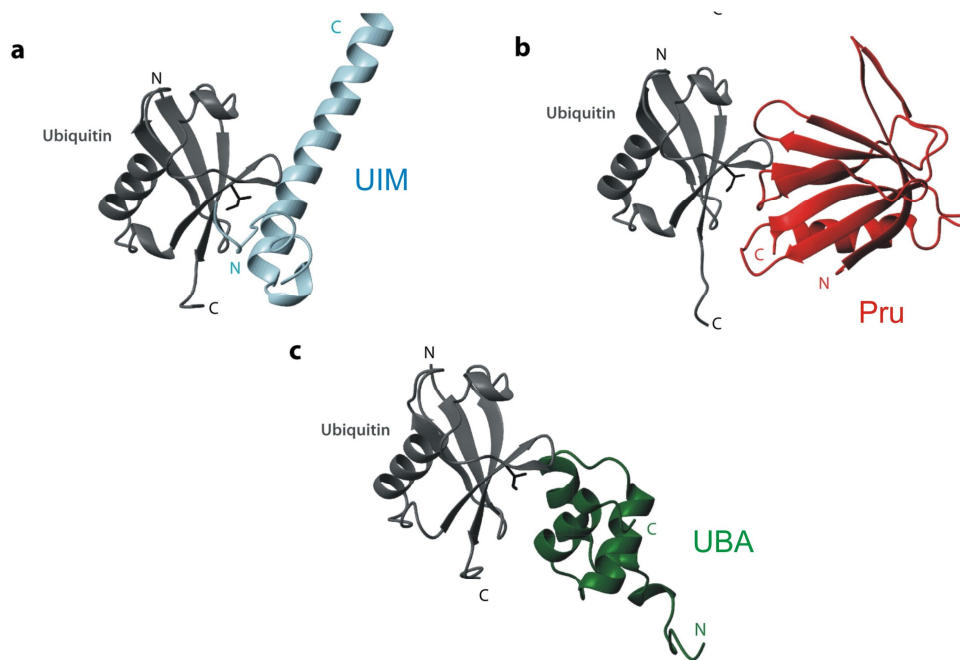
Az utóbbi idők nagy szenzációját jelentette, mikor kiderült, hogy a humán S5a képes közvetett és közvetlen kapcsolatot létesíteni egy másik poliubiquitin receptorral, a Rad23-mal¹⁴¹. A kísérleti eredmények szerint a Rad23 N-terminális ubiquitin-szerű (UBL) doménje nagy affinitással kötődött az S5a extra UIM2 motívumához (közvetlenül), míg a Rad23-szállította poliubiquitilált fehérje ubiquitin egységei UIM1-hez kapcsolódva stabilizálták a kialakult komplexumot (közvetetten). Később kimutatták, hogy egy másik poliubiquitin receptor, a Dsk2 is képes kölcsönhatásba lépni az élesztő Rpn10-zel, de ennek mechanizmusa más, mint a humán Rad23-S5a kapcsolatnak. Élesztőben ugyanis kizárólag a Dsk2 UBA doménje és az Rpn10 egyetlen UIM-a (ami a humán S5a UIM1-nek felel meg) között alakul ki a kapcsolat^{142,143}. Kiderült, hogy a proteaszómáról disszociált Rpn10 kiszелеktálja a szubsztrátot nem kötő Dsk2-t, meggátolva az üres receptor proteaszómához történő transzportját. A szubsztráttal töltött Dsk2-t viszont beszállítja a 26S proteaszómába. A fenti megfigyelések kétségtelenül igazolják a proteaszóma Rpn10/S5a/p54 poliubiquitin receptorának extraproteaszómális létezését és funkcióját, ami viszont az alegység ingázásának⁹⁸ képességét feltételezi (9. ábra).

II. Rad23, Dsk2 és Ddi1.

A Rad23, Dsk2 és Ddi1 poliubiquitin receptorok nem a 26S proteaszóma alegységei¹⁴⁴⁻¹⁴⁸. Eredetileg mindhárom fehérjét különböző biokémiai folyamatok szereplőiként azonosították, s csak később derült fény kettős funkciójukra. A „radiáció érzékeny 23” (Rad23) a nukleotid kivágódásos DNS hibajavítás egyik kulcsfigurája¹⁴⁹. A “DNS sérülés indukálta 1” (Ddi1) szintén a DNS hibajavításának folyamatában vesz részt¹⁵⁰, de proteolitikus aktivitása is ismert. A „Karl domináns szupresszor 2” (Dsk2) fehérjét pedig eredetileg a sarjadzó élesztő SPB (spindle pole body - orsó poláris testecske) deficiens mutánsaiban fedezték fel¹⁵¹, míg magasabbrendűekben elsősorban a központi idegrendszerben betöltött szerepe miatt vált érdekes célponttá, főként neurodegeneratív betegségek modellrendszereiben¹⁵².

Mindhárom receptor az UBA/UBL fehérjék családjába tartozik, melyek közös jellemzője az N-terminális ubiquitin-szerű (UBL – ubiquitin-like), valamint a centrális és/vagy C-terminális

ubiquitinnel kölcsönható domén (UBA – ubiquitin associated) (7. ábra). Az UBL domén a 26S proteasóma regulátor komplexéhez történő dokkolást végzi^{153,154}, míg az UBA domén, amely három alfa hélixből álló köteg (8C. ábra), nagy affinitással képes kötődni az ubiquitinhez vagy ubiquitin-szerű domént tartalmazó fehérjékhez¹⁵⁵. Ez a tulajdonsága, habár alkalmassá teszi a poliubiquitilált fehérjék megkötésére, egyfajta önszabályozási rendszer kialakításához is vezetett¹²⁶. Ennek egy jó példája a humán Rad23, amelynek UBL és UBA doménje alapállapotban kölcsönhat egymással⁷⁶. Szabad UBL hiányában pedig a Rad23 nem képes a proteasóma Rpn1 alegységéhez kötődni. Ha azonban egy poliubiquitilált fehérje kerül a Rad23 közelébe, az UBA domén elengedi az UBL-t, és megköti a szubsztrátot. A felszabadult UBL ezután az S5a-n keresztül az Rpn1-hez vezényli a Rad23-szubsztrát komplexumot (9. ábra). Nem csak intra-, de intermolekuláris UBA-UBL kölcsönhatásokra is ismerünk példát, amelyek két azonos, de inkább két különböző UBA/UBL receptor között alakulnak ki¹⁴¹.



8. ábra. Az ubiquitin és az ubiquitin-kötő szerkezeti elemek kapcsolódási modellje⁷⁶.

(A). Az Rpn10/S5a/p54 UIM-nak (**kék**), (B) az Rpn13/ADRM1/p42E Pru- (**piros**) és (C) a Dsk2 UBA doménjének (**zöld**) szerkezete és ubiquitinhez (**fekete**) való kapcsolódásának 3D modellje.

Az ilyen fajta ön- és kölcsönös szabályozás lényegét és pontos megvalósulásának mechanizmusát ma még nem teljesen ismerjük. Amit biztosan tudunk, hogy e heterogén receptor csoport tagjai kölcsönhatnak egymással UBA, UBL és UIM szerkezeti elemeiken keresztül, amely interakció bonyolódik a receptorok számával (paralógok, splice-formák, posztisztetikus modifikációk) és összetettségével a különböző organizmusokban.

III. Rpn13/p42E.

2008-ban egy újabb poliubiquitin receptort azonosítottak élesztőben^{156,157}. Az Rpn13/ADRM1/p42E (élesztő/humán/*Drosophila*) a 26S proteaszóma második olyan alegysége, amely nagy affinitással képes kötni a poliubiquitilált fehérjéket. Habár az egyes eukarióta fajokban található Rpn13 ortológok elsődleges fehérjeszerkezete eltérő, mindegyik tartalmaz egy N-terminális konzervált funkcionális egységet, az ún. pleckstrin homológ domént (7. és 8. ábra), amelyről hamar kiderült, hogy az ubiquitin kötéséért felelős. Innen származik új neve is, a 'pleckstrin-szerű ubiquitin receptor' domén (Pru – pleckstrin-like receptor for ubiquitin). A Pru domén hét β -lemezből álló szendvics, amelyet egy α -hélix stabilizál. Az ubiquitinhez a β -lemezeket összekötő három hurok kapcsolja (8B. ábra)⁷⁶. Az Rpn13/ADRM1/p42E C-terminálisa egy deubiquitilázsal, az Uch37-tel létesít kapcsolatot¹⁵⁸. Mai elképzelésünk szerint az Rpn13/ADRM1/p42E N-terminális Pru doménjével egyidejűleg képes kapcsolódni a proteaszóma Rpn2 alegységéhez és a poliubiquitilált fehérjékhez, míg C-terminálisával az Uch37-hez. Ez a térközelség lehetővé teszi az Uch37 számára az Rpn13 által kötött poliubiquitin lánc közvetlen és gyors lehasítását, ami végül a szubsztrát gyorsabb és hatékonyabb lebontásához vezet (9. ábra).

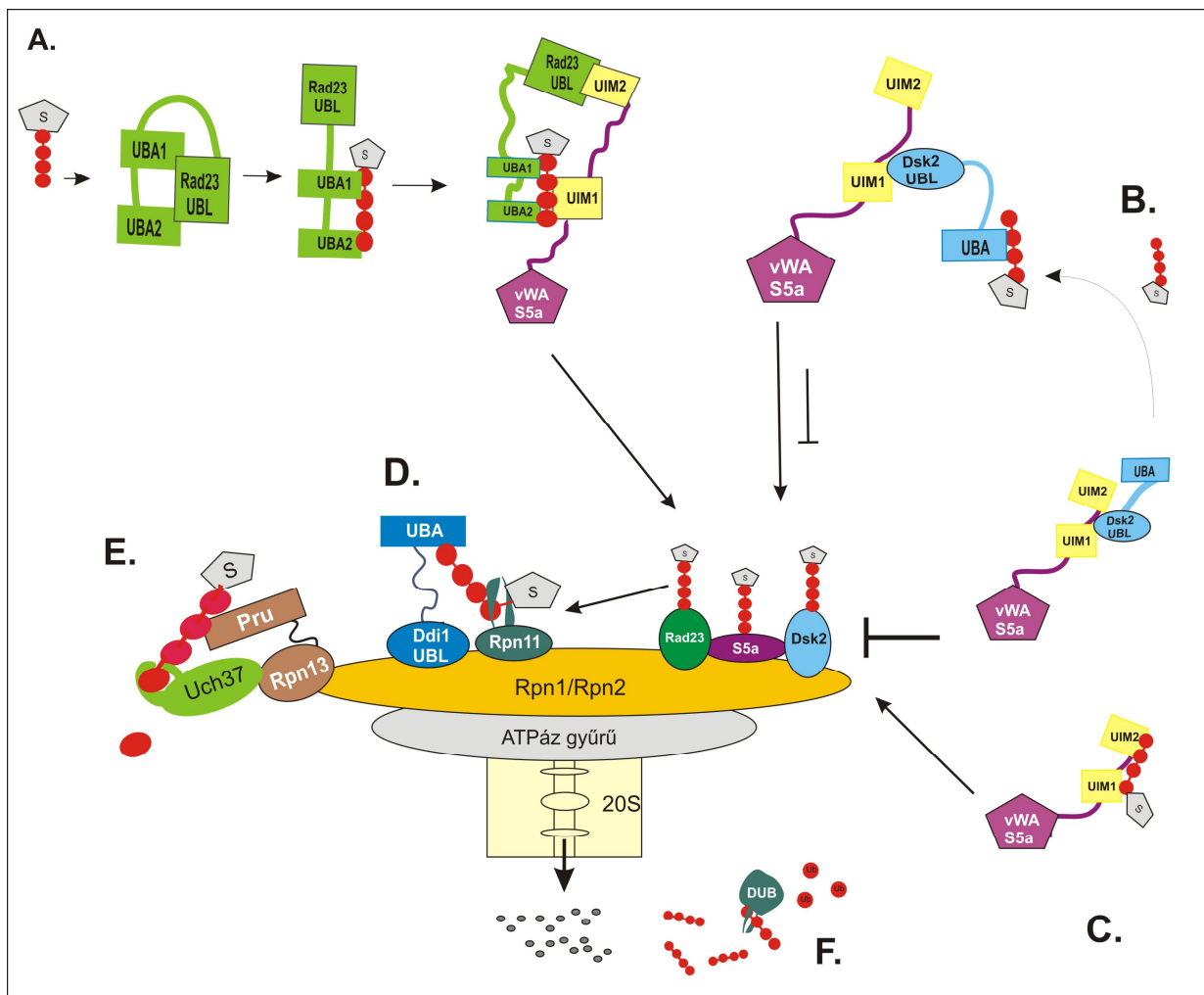
A poliubiquitin receptorok működésének összefoglalása

A poliubiquitin receptorok működéséről és felépítéséről számtalan információ gyűlt össze az irodalomban. Talán éppen ezért még senki sem vállalkozott arra, hogy egy egységes, egy fajra jellemző modellt állítson össze és jelentessen meg szemleci formájában. Pedig erre nagy szükség lenne, hiszen amint a fenti fejezetben láthattuk, bármennyire is konzervált folyamatokról van szó, fajoként jelentős különbségek is jelentkehetnek.

A legfrissebb irodalmi adatok alapján a következő „vegyes” modell állítható össze. A szubsztrátot szállító UBA/UBL poliubiquitin receptorok között az Rpn10/S5a/p54 egyfajta sorrendet határoz meg. A disszociált extraproteasómális Rpn10/S5a/p54 önmaga is képes poliubiquitilált fehérjéket kötni, melyeket a proteaszóma Rpn1/2 komplexéhez szállít (9C. ábra). Ennél érdekesebb, hogy az üres Dsk2 UBL doménjét UIM(1) motívumával megköti, és mindaddig nem engedi a proteaszóma felé, amíg a Dsk2 szubsztráttal nem töltődik (9B. ábra). A Rad23 üres állapotban inaktív, ugyanis UBL doménje kapcsolatba lép saját (vagy más Rad23) UBA1/2 egységeivel. A szubsztrát jelenlétében (9A. ábra) felszabadulnak az UBA domének és megkötik a poliubiquitilált fehérjét, de szabaddá válik az UBL is, amit viszont az (Rpn10)/S5a/p54 UIM(2) motívuma köt meg. Az így létrejött komplexum együtt szállítódik a regulátor partikulum Rpn1/2 felszínéhez. A szubsztráttal töltött Ddi1 UBL doménjével közvetlenül kapcsolódik a proteaszóma felé (9D. ábra).

A regulátor komplex egy másik érdekes helyszíne az Rpn13/p42E és Uch37/p37A alkotta egység. Az Rpn13/p42E Pru-doménje megköti a poliubiquitin láncot, amiről az Uch37/p37A ubiquitin C-terminális hidroláz egyesével lehasítja az ubiquitint. Ezzel szemben az Rpn10/S5a/p54, Dsk2, Rad23 és Ddi1 szállította fehérjékről a poliubiquitin láncot proteasómális deubiquitilázok (DUB), pl. az Rpn11/p37B metalloproteáz hasítja le, amit azután citoszolikus DUB enzimek (9F. ábra) ubiquitin monomerekké darabolnak fel. A deubiquitilált szubsztrátot a bázis ATPáz alegységei letekerik, majd bejuttatják a 20S proteaszóma központi magjába, ahol az lebomlik.

Munkánk során arra vállalkoztunk, hogy feltérképezzük a *Drosophila melanogaster* poliubiquitin receptorainak hálózatát, megismerjük strukturális elemeiket, és meghatározzuk működésük menetét. Mondanom sem kell, sok meglepetést és örömet hoztak a kísérleti eredmények.



9. ábra. A poliubiquitin receptorok feltételezett működési modellje a humán-, élesztő- és muslica irodalom alapján.

(A) A Rad23 UBL-UBA doménjei kölcsönhatnak (inaktív), de ha szubsztrát van a közelben, akkor az UBA domének megkötik a poliubiquitin láncot, a Rad23 aktiválódik, az UBL pedig az extraproteasómális Rpn10/S5a/p54 UIM-hoz kapcsolódik. A töltött Rad23-at Rpn10/S5a/p54 a proteasóma Rpn1/Rpn2 komplexéhez szállítja.

(B) Az extraproteasómális Rpn10/S5a/p54 UIM motívumával megköti az üres Dsk2-t (UBL doménjét), és nem engedi, hogy a proteasómához feleslegesen dokkoljon. Ha a Dsk2 szubsztrátot köt, az Rpn10/S5a/p54 a prioritási sorrendnek megfelelően tovább gátolja, vagy a proteasómához szállítja a Dsk2-szubsztrát komplexet.

(C) Az extraproteasómális Rpn10/S5a/p54 UIM motívumával maga is képes szubsztrátokat kötni.

(D) A Ddi1 UBL doménje dokkol az Rpn1/2 komplexhez és UBA doménjével hozza a lebontandó fehérjét, amiről a poliubiquitin láncot az Rpn11/p37B metalloproteáz vágja le.

(E) Az Rpn13/p42E Pru-doménje megköti a poliubiquitilált fehérjét, miközben az Rpn1/2 komplexhez és az Uch37 deubiquitilázhoz kapcsolódik. Az Uch37/p37A ledarabolja a poliubiquitin láncot, majd a szubsztrát lebomlik.

(F) A szabad poliubiquitin láncokat citoszolikus DUB (deubiquitiláz) enzimek darabolják monomerekké.

S – szubsztrát; 20S – 20S proteasóma; ATPáz-gyűrű-Rpn1/2-Rpn13-S5a – regulátor komplex bázisa; vWA – von Willebrand-A domén; UBL – ubiquitin-szerű domén; UBA – ubiquitinnel asszociáló domén; Ub – ubiquitin (piros kör); → - aktiválás, vagy folyamat; ⊥ - gátlás; S5a – reprezentálja az Rpn10/S5a/p54 ortológokat.

CÉLKITŰZÉS

Ellentétben az élesztő Rpn10 poliubiquitin receptorával, a *Drosophila melanogaster* Rpn10 ortológja a p54, esszenciális alegysége a 26S proteaszómának¹³³. *In vitro* kísérleteinkből tudtuk, hogy a p54 megfelelően magas koncentrációjú Zn^{2+} jelenlétében képes reverzibilisen disszociálni a 26S proteaszóma holoenzimről, amit ráadásul a proteaszóma alkompexumaira történő szétesése követ. A Zn^{2+} eltávolítását követően azonban a Hsp82 dajkafehérje segítségével a p54 visszaépül a katalitikusan aktív 26S proteaszómára – ezt a folyamatot hívja ma a szakirodalom ingázásnak. Korábban nem állt rendelkezésünkre olyan adat, ami a p54 *in vivo* ingázását és a proteaszómától független létezését és funkcióját igazolta volna, ezért olyan *in vitro* és *in vivo* rendszer kidolgozását és alkalmazását tűztük ki célul, amely bizonyosságot adhat a fenti folyamat létezésére. Feltételezésünk szerint a p54 *in vivo* ingázásának eddigi igazolása a folyamat rövidsége és a szabad p54 alacsony koncentrációja miatt nem sikerült. Ezért transzgénikus muslicák létrehozását terveztük, melyek különféle (teljes- és csonkolt) fehérjék túltermeltetésével a p54 *in vivo* extraproteaszómális stabilizálódásához vezethetne. A kiindulási hipotézisünk az volt, hogy ha túltermeltetjük a p54-et vagy a p54 N-terminális felét (NTF), akkor a feleslegben lévő transzgénikus fehérje a vWA domén (11. ábra) révén beépül a proteaszómába, kiszorítva ezzel az endogén p54-et, amely azután extraproteaszómális stabilizálódik. Vagy fordítva: ha túltermeltetnénk a p54 vWA doménjét nem tartalmazó C-terminális felét (CTF), a proteaszómához nem kötődött, feltehetően szabadon felhalmozódó transzgénikus fehérje modellezhetné az extraproteaszómális állapotú endogén p54-et. Ha ez sikerülne, akkor megvizsgálhatnánk és azonosíthatnánk a feltételezett poszttranszlációs módosításokat, amelynek hatására a p54 képes leválni, vagy éppen visszaépülni a 26S proteaszómába, és azonosíthatnánk a p54-gyel extraproteaszómális kölcsönható fehérjéket következtetve a szabad p54 funkciójára.

A p54 alegység lehetséges *in vivo* ingázó sajátosságának egy speciális esetére az a megfigyelésünk vezetett, hogy szemben az élesztő Rpn10 alegységével, mely az élesztő 26S proteaszóma sztöchiometrikus komponense, a különféle fejlődési stádiumok heterogén keverékéből tisztított *Drosophila* 26S proteaszómában a p54 alegység szubsztöchiometrikus mennyiségben volt jelen. Ezzel szemben a szinkronpetéztetésből származó korai *Drosophila* embriókból preparált 26S proteaszómában a p54, mint sztöchiometrikus alegység jelent meg. A p54 szubsztöchiometrikus előfordulását elvileg két lehetséges úton magyarázhattuk: a

hosszadalmas tisztítás során elveszett a p54 és/vagy a proteaszóma p54 alegységének koncentrációja a muslica egyedfejlődése során specifikusan szabályozott. Ez utóbbi esetben fontosnak tartottuk megvizsgálni a reguláció mechanizmusát és az ebben résztvevő komponenseket: vajon a p54 receptor szintjét transzkripció, transzláció és/vagy proteolitikus folyamatok határozzák-e meg, és ha igen, milyen transzkripció faktorok és/vagy proteázok játszanak ebben szerepet? A fenti kérdések tisztázására tervbe vettük a 26S proteaszóma alegységösszetételének fehérjeszintű vizsgálatát, valamint a kritikus alegységek transzkriptumainak analízisét legalább 15 különböző fejlődési állapotban az embriótól a kifejlett állatokig. A p54 mellett fontosnak tartottuk a *Drosophila* Rpn13/p42E, Rad23, Dsk2 és Ddi1 poliubiquitin receptorainak átfogó vizsgálatát is. Ennek érdekében célunk volt a fenti fehérjéket kódoló cDNS-ek azonosítása és expressziós vektorokba klónozása, majd a rekombináns fehérjék funkcionális és strukturális analízise. Hasonlóan a p54-hez, tervbe vettük a fenti receptorok transzkriptum és fehérjeszintű nyomon követését is a muslica ontogenezisének különböző stádiumaiban.

A kérdéseinkre kapott válaszoktól vártuk, hogy egy egységes modellé álljanak össze magyarázatul szolgálva a *Drosophila* p54 receptorának extraproteasómális funkciójára, valamint a p54 és egyéb poliubiquitin receptorok feltételezett fejlődésstádium-specifikus szabályozásának mechanizmusára és biológiai értelmére.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

In vivo kísérletek és mintagyűjtés

Az *in vivo* kísérletekben használt *Drosophila melanogaster* laboratóriumi törzseket 25°C-on, 25 mm átmérőjű üveg fiolákba töltött standard táptalajon növesztettük. A szinkronpetéztetési és a hősokkolásos kísérletekben ettől eltérő körülményeket alkalmaztunk, amit a megfelelő fejezetben tárgyalok. Kontrollként (vad típus), valamint a transzgénikus állatok létrehozásakor w^{1118} izogenizált alaptörzset használtunk¹⁵⁹. A megfelelő genetikai markerek meghatározását az általános protokoll szerint végeztük¹⁶⁰ (<http://flybase.bio.indiana.edu/>).

P-elem inszerciós transzgénikus *Drosophila* törzsek létrehozása

A transzgénikus törzseket (melléklet) P-elem mediálta transzgén inszerciós technikával hoztuk létre^{161,162}. A P-elem alapú rekombináns plazmidokat, melyek a kifejezendő transzgént hordozták, szinkronizált szinciciális blasztoderma állapotú embriók poszterior végébe injektáltuk transzpozázt kódoló segítőplazmid kíséretében. Ezt követően keresztezésekkel¹⁶³ a P-elemre homozigóta, balanszírozott és genetikai markerekkel megjelölt alaptörzseket hoztunk létre (melléklet). A legfontosabb alaptörzsek:

C18: a CTF (p54 C-terminális felét) transzgént hordozza

8SC: a Strep-CTF transzgént hordozza

Strep-p54(7): a Strep-p54 transzgént hordozza

Strep-NTF: a Strep-NTF transzgént hordozza

ΔK: a Strep-CTF-ΔK transzgént hordozza

p54^{RNSi}: a p54 RNS-interferencia konstrukciót hordozza

Dsk2^{RNSi}: a Dsk2 RNS-interferencia konstrukciót hordozza

Dsk2^{Flag}: a Flag-Dsk2 transzgént hordozza

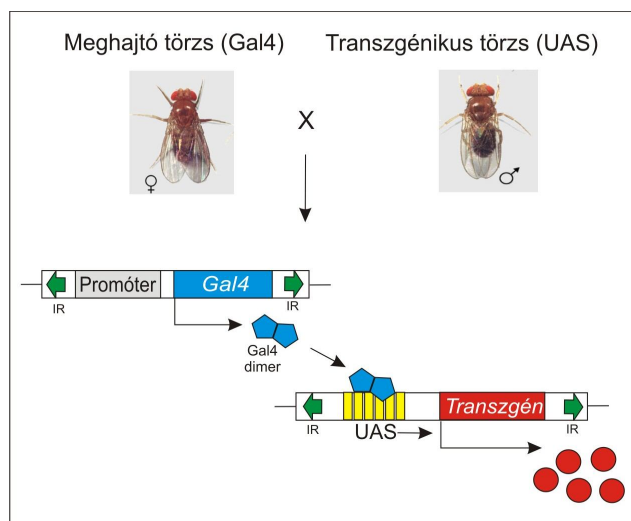
Rad23^{Flag}: a Flag-Rad23 transzgént hordozza

Rad23^{RNSi}: a Rad23 RNS-interferencia konstrukciót hordozza (VDRC: #30497)¹⁷⁷

A transzgén kifejeződésének indukálása: az UAS-Gal4 rendszer

Az UAS-Gal4 rendszer¹⁶⁴ lényege, hogy az élesztő eredetű UAS (upstream activating sequence: CGGAGTACTGTCCTCCG) szekvencia a töle downstream elhelyezkedő tetszőleges DNS (pl. cDNS, transzgén) átíródását mindaddig nem aktiválja a *Drosophila* sejtjeiben, amíg egy

élesztő eredetű transzkripciós faktor, a Gal4 (homodimer) hozzá nem kapcsolódik. Az alaptörzsek létrehozásakor használt pP{UAST} vektor öt UAS szekvenciát tartalmaz a klónozó régió előtt. Ha a transzgénikus legyeket egy ún. meghajtó törzzsel (Gal4-et termel) keresztezzük össze, akkor az utódokban a Gal4-dimer hozzákapcsolódik az UAS elemekhez, és indukálja a transzgén átíródását (10. ábra.). A kísérleteinkben alkalmazott *da-Gal4* (da – *daughterless*: konstitutív promóter) az egyedfejlődés minden stádiumában és minden szövetben kifejeződik. A hősokkolásos kísérletekben egy olyan Gal4-represszort is közbeiktattunk (Gal80^{ts20}), amely 19-25°C-on kötődve a Gal4-hez gátolja a transzgén átíródását. 30°C-ra helyezve az állatokat a Gal80^{ts20} konformációváltozást szenved, leválik a Gal4-ről, ami újra aktiválja a transzgént.



10. ábra. Az UAS/Gal4 rendszer működési modellje.

Az utódban Gal4 transzkripciós faktor termelődik, ami dimert alkotva önmagával az integrálódott P-elem UAS szekvenciájához kötődve aktiválja a bevitt transzgénikus konstrukció átíródását. IR – fordított ismétlődések, a P-elem végeit és az integráció helyét jelöli.

Szinkronpetéztetés

A *Drosophila melanogaster* teljes átalakulással fejlődő rovar. Egyedfejlődése 25°C-on 10 napot vesz igénybe. A megtermékenyülést követően a lerakott pete burkán belül 1 nap alatt lejátszódik az embrionális (E) fázis. Az embrióból első stádiumos lárvák kelnek ki (L1), melyek egy nap elteltével vedlenek második stádiumos (L2), majd újabb egy nap múlva harmadik stádiumos (L3) lárvákká. Ezután az állatok bebábozódnak és további öt napig fejlődnek. Eközben

számos morfológiailag is jól elkülöníthető fejlődési állapoton mennek keresztül. Kutatásaink során korai ún. fehér bábokat (a lárvastádiumot követő néhány perces előbáb állapot), 2 napos barna bábokat és az adulttá válást közvetlenül megelőző farát adult bábokat (ebben az utolsó bábstádiumban az állat már az összes adult-specifikus morfológiai bélyeget viseli, de még körülveszi a báb héja) vizsgáltuk. Az ontogenezis utolsó lépéseként a farát adultból kifejlett, szaporodni képes imágó (adult kor) kel ki, amely csupán néhány hétig életképes¹⁷⁰. Mivel a kifejlett nőstény a megtermékenyített petét képes visszatartani (pl. táplálékhiány esetében), ezért azonos korú minták gyűjtésekor a nőstény petézését (lerakott petéinek korát) gazdag táptalajon történő nevelés mellett szinkronizálni kell.

A petezés szinkronizálásához¹³² a szűz nőstényeket (a vad típusú és a C18 transzgénikus törzsekből külön-külön) táplálékkal gazdagon megszórt standard táptalajon tartottuk 1 napig. Ezt követően megfelelő hímeket (a vad típusú nőstényekhez vad típusút; a C18-kontroll nőstényekhez C18-ast; az indukálendő C18 nőstényekhez pedig da-Gal4-et) adtunk a nőstényekhez, és a bekeresztezett muslicákat speciális táptalajra (1,6 % (g/v) lacto-agar, 0,8 % (g/v) D-glükóz, aktív szén, 10% gyümölcs szirup és 0,15 % (g/v) nipagin) helyeztük. A táptalajt óránként frissre cseréltük, a petéket tartalmazót pedig a pete lerakásától számított különböző ideig tovább inkubáltuk (25°C). Az inkubációs idő elteltével a vad típusú csoportból a következő korú és stádiumú biológiai mintákat gyűjtöttük: 0-12 és 12-24 órás embrió; 36 és 48 órás L1; 60 és 72 órás L2; 84, 96, 108 és 120 órás L3; fehérbáb, barna báb, farát adult és frissen kikelt nőstény és hím. A C18 (kontroll) és C18/daGal4 (transzgént termelő) csoportokból csak 84, 96, 108 és 120 órás L3-at szedtünk. A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

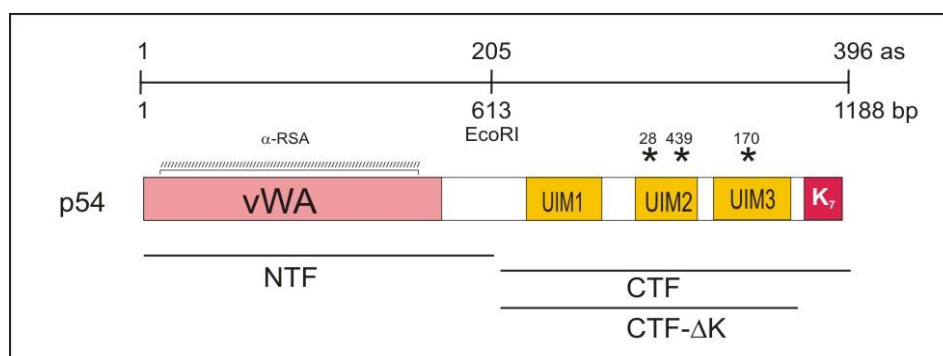
***In vitro* módszerek**

***In vitro* DNS rekombinációs technikák és PCR**

Klónozás. A Rad23 (CG1836), Dsk2 (CG14224: *Ubiquilin*), Ddi1 (CG4420) és p42E (CG13349) fehérjéket kódoló cDNS-eket *Drosophila* L3-cDNS könyvtárból PCR-rel amplifikáltuk specifikus oligonukleotid primereket (melléklet) és GoTaq (Promega) polimerázt használva (25 x (95°C, 30"; 60°C, 30"; 72°C, 1')). A cDNS-eket az oligonukleotid primerekkel bevitt egyedi

restrikciós hasítóhelyek mentén emésztettük és pBlueScript vektorba klónoztuk, majd DNS-szekvenciameghatározással ellenőriztük. A pBlueScript/p54 korábbi kísérletekből már a rendelkezésünkre állt¹¹⁹. A cDNS-eket és darabjaikat ezután a kísérletek igényei szerint standard *in vitro* DNS rekombinációs technikák¹⁶⁵ segítségével különböző plazmidokba klónoztuk:

1. pGEX-4T.1-2-3 (GE Healthcare): A GST-hez fuzionált rekombináns fehérjék termeltetéséhez a Rad23, Dsk2, Ddi1, p42E és p54 cDNS-ét a GST-vel azonos leolvasási keretbe pGEX-4.T alapú vektorba klónoztuk, majd a pull-down kísérletekhez a rekombináns fehérjék csonkolt (különböző doméneket hordozó) változatait is előállítottuk (15. ábra.).
2. pASK-IBA5 (IBA): A Strep-fuzionált rekombináns fehérjék termeltetéséhez a p54 cDNS-ének különböző méretű darabjait (1-1188 bp (Strep-p54); 1-613 bp (Strep-NTF [N-Terminális Fél]) a vWA doménnel; 614-1188 bp (Strep-CTF [C-Terminális Fél]) a három UIM-mal; 614-1143 bp (Strep-CTF-ΔK) a CTF terminális lizinek nélkül; 11. és 22. ábra) a Strep-affinitás címkével egy leolvasási keretbe illesztettük:



11. ábra. A p54 fehérje sematikus képe.

A p54 doménszerkezete: **vWA** – von Willebrand-A domén; **UIM 1-2-3** – ubiquitin interakciós motívumok; **K₇** – a hét konzervált terminális lizin; * - A p54 C-terminális felét (CTF) felismerő monoklonális ellenanyagok (28, 439 és 170) epitópjai. ///// - A p54 N-terminális felére (NTF) specifikus poliklonális ellenanyag (α-RSA#1) epitópjainak feltételezett helye.

3. pP{UAST} (Drosophila Genomics Resource Center): A transzgénikus alaptörzsek létrehozásához¹³² a Strep-p54, a Strep-NTF, a Strep-CTF, a Strep-CTF-ΔK DNS konstrukciókat, a p54 cDNS-ének 614-1188 bp-ig terjedő szakaszát, valamint a Flag-Dsk2-t és a Flag-Rad23-at kódoló DNS-t átklónoztuk a P-elem alapú pP{UAST} ingázó vektorba. A rekombináns plazmidok segítségével különálló stabil transzgénikus vonalakat hoztunk létre,

így lehetőség nyílt a Strep-p54, Strep-NTF, Strep-CTF, Strep-CTF-ΔK, CTF (22. ábra) Flag-Dsk2 és Flag-Rad23 Gal4-indukálta *in vivo* túltermeltetésére és a transzgénikus fehérjék *in vivo* vizsgálatára.

4. pWIZ (Drosophila Genomics Resource Center): A p54 és a Dsk2 RNS-interferenciás törzsek létrehozásához módosított pP{UAST} vektort, a pWIZ-t használtuk. A vektor különlegessége, hogy a két polilinker szekvencia között egy intron található. A fordított orientációban (3'-5' – intron – 5'-3') beépített két azonos szekvenciájú DNS darab között elhelyezkedő intron elősegíti az UAS aktivációt követően átíródott transzkriptum duplaszálúvá (dsRNS) alakulását. A p54-re és Dsk2-re egyedileg jellemző DNS szekvenciákat, amelyek az RNS-interferencia során mintaként szolgálnak a RISC komplexnek a p54- illetve a Dsk2 transzkriptumok eliminációjához, az online elérhető dsCheck¹⁷⁸ (<http://dscheck.rnai.jp/>) program segítségével határoztuk meg. A p54 cDNS-ének 1-400 bp-ig (1. és 2. exon), míg a Dsk2 cDNS-ének 825-1252 bp-ig (2. exon) terjedő szakaszát specifikus oligonukleotid primerek segítségével (melléklet) PCR-rel amplifikáltuk, majd a pWIZ vektorba klónoztuk külön-külön. Az egyedi DNS szekvenciákat fordított ismétlődésként hordozó rekombináns plazmidok segítségével stabil transzgénikus vonalakat hoztunk létre. A Gal4 aktivációt követően a konstrukciókról átíródott transzkriptumok dsRNS-sé alakulva a *Pros54* (p54) és *Ubiquilin* (Dsk2) mRNS-ek specifikus eliminációját okozták külön-külön.
5. pCYB (NEB): A CBD-fuzionált (CBD – kitin kötő domén; chitin-binding domain) rekombináns fehérjék előállításához a p54 cDNS-ének 1-1188 bp-ig (CBD-p54), 1-613 bp-ig (CBD-p54-NTF) és 614-1188 bp-ig (CBD-p54-CTF) terjedő szakaszait pCYB bakteriális expressziós vektorba klónoztuk (a CBD-vel egy leolvasási keretbe) a gyártó utasításainak megfelelően.
6. pFlagMac (Sigma Aldrich): A Flag-fuzionált rekombináns fehérjék előállításához a Rad23, Dsk2 és p54 cDNS-ét az N-terminális Flag-epitópot kódoló DNS-sel egy leolvasási keretbe klónoztuk a gyártó utasításainak megfelelően (Flag-Rad23, Flag-Dsk2 és Flag-p54).

Szemikvantitatív reverz transzkripcióval kapcsolt PCR. A vizsgált biológiai mintákból az össz RNS-t Trizol™ reagenssel (Invitrogen) preparáltuk a gyári protokollnak megfelelően. Az RNS-t

DNS-mentesítettünk (RQ1 DNázssal, 30 perc, 37°C (Promega)), majd M-MuLV reverz transzkriptázzal (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)) oligo-dT primer jelenlétében cDNS könyvtárat készítettünk. A cDNS mintákat templátként használva, GoTaq (Promega) polimeráz felhasználásával PCR-t végeztünk (25 x (95°C, 30"; 60°C, 30"; 72°C, 1')) *rpL17a* (bemérési kontroll), *Pros54* (p54), *p48B*, *Rad23* és *Ubiquilin* (Dsk2) specifikus oligonukleotid primerekkel (melléklet).

Fehérjeminták készítése

Általános. A lefagyasztott (pl. különböző fejlődési stádiumban gyűjtött) biológiai mintákat frissen elkészített 26S proteaszóma alappufferben (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT and 5% (v/v) glicerín) tártuk fel micro-Potter homogenizátor segítségével. A szöveti törmeléket centrifugálással távolítottuk el (2x14.500g, 4°C, 5 perc), majd a tiszta felülúszót két részre osztottuk. Az első adaghoz Laemmli-féle denaturáló SDS-mintapuffert adtunk (2,3 % (g/v) SDS (nátrium-dodecil-szulfát), 5 % (v/v) merkaptó-etanol, 10 % (v/v) glicerín és bróm-fenol-kék festék) és azonnal felforraltuk (5 perc) - kontroll. A másik adagot kisebb mennyiségekben, natív állapotában -80°C-on tároltuk.

Speciális. A gélszűrési kromatográfia során felhasznált fehérjeextraktumot a fentiekhez hasonlóan készítettük el. A második centrifugálást követően a felülúszóban maradt lebegő lipopoliszaharidokat steril üveggyapoton átfolyatva távolítottuk el. Ezt követően a megmaradt sejttörmeléket további ultracentrifugálással (30 perc, 2°C, 60. 000 g) üleptítettük ki.

Töményítés. A kromatográfiák során eluált híg fehérjefrakciókat 10 % (g/v) végkoncentrációban alkalmazott, hideg triklór-ecetsav (TCA) hozzáadásával precipitáltuk (5 perc, 4°C). A csapadékot centrifugálással (14.500g, 4°C, 5 perc) üleptítettük, majd a felülúszó eltávolítását követően a kiindulási térfogatnak megfelelő mennyiségű hideg acetonnal mostuk. A szárított csapadékot SDS-mintapufferben feloldottuk és azonnal felforraltuk (5 perc).

Fehérjék kromatográfiás tisztítása

Gélszűrési-kromatográfia. A Superose 6 mátrixszal (Amersham Biosciences) töltött 2 cm átmérőjű és 50 cm magas üvegoszlopot ÄKTA™ FPLC™ (Amersham Biosciences) fehérje-elválasztási rendszerben alkalmaztuk. A 2-2 ml fehérjeminta betöltését követően 0,4 ml/perc

folyási sebesség mellett szűrt proteaszóma alappufferben 4°C-on végeztük az elválasztást. A kizárási térfogat átfolyását követően 60 1-1 ml-es frakciót gyűjtöttünk (#1-60.), majd minden második frakcióból 200-200 µl-t betöményítettünk és SDS-PAGE/immunoblottal vizsgáltunk.

Affinitás-kromatográfia.

1. Strep-Tactin[®]-affinitáskromatográfia (IBA). A 8SC, da-Gal4/8SC és da-Gal4/ Δ K transzgenikus állatok lárváit homogenizáló pufferben (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 1 mM ATP; 1mM DTT; 1mM PMSF) tártuk fel. Az előkészítést követően a fehérjeextraktumokat equilibrált minioszlopba (Strep-Tactin[®] Spin Column (IBA) töltöttük (5x cirkuláltattuk), majd a nem kötődött fehérjéket kimostuk (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM ATP; 1mM DTT; 1mM PMSF). Végezetül a Strep-Tactin[®]-hoz fajlagosan kapcsolódott Strep-CTF és ubiquitilált Strep-CTF (da-Gal4/8SC-ből), valamint Strep-CTF- Δ K (da-Gal4/ Δ K-ból) fehérjéket eluáltuk (100mM Tris-HCl pH 8,0; 150mM NaCl; 2mM D-biotin; 1mM PMSF) és SDS-PAGE/Immunoblottal vizsgáltuk.
2. Kitin-affinitáskromatográfia (NEB). A CBD-p54 és CBD-p54-CTF fehérjéket B121(DE-3) *E. coli* törzsben termeltettük¹⁶⁵. A transzformált baktériumokat 50-50 ml tápoldatban 37°C-on (YTA+0,1 mg/ml ampicillin) OD₆₀₀=0,4-ig növesztettük, majd 0,5 mM végkoncentrációban alkalmazott IPTG hozzáadásával indukáltuk a rekombináns fehérjék termelődését (3 óra, 37°C). A sejteket centrifugálással ülepitettük (2x500g, 4°C, 5 perc), mostuk, proteaszóma alappufferben ultraszonikálással feltártuk, majd a sejttörmeléket kicentrifugáltuk.
 - A. In vitro ubiquitiláció. A CBD-p54-CTF felülúszót proteaszóma alappufferrel (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT and 5% (v/v) glicerine) equilibrált kitin-agaróz (NEB) oszlopba (0,5x5 cm) töltöttük és 1 órán át 25°C-on cirkuláltattuk. Az aspecifikusan kötődött fehérjéket kimostuk. Ezt követően vad típusú *Drosophila* embriók extraktumát a CBD-p54-CTF-fel töltött oszlophoz adtuk, 1 mM ATP és 1 µg/ml ubiquitin jelenlétében 25°C-on 60 percig keringtettük, majd alaposan kimostuk. A CBD-p54-CTF és *in vitro* ubiquitilált formáit 1 % (g/v) SDS tartalmú proteaszóma alappufferrel eluáltuk és SDS-PAGE/Immunoblottal analizáltuk.
 - B. Az endogén p54 kicserélése CDB-p54 és CBD-p54-NTF-re. *Drosophila* embriók extraktumát Sephadex G25 gélszűrőoszlopon DTT-mentesítettük. 200 µM ZnCl₂

hozzáadásával (20 perc, 25°C) előidéztek a 26S proteaszóma alkompexumaira és szabad p54-re történő szétesését⁹⁸. Ezt követően CBD-p54, CBD-p54-NTF és CBD-p54-CTF bakteriális extraktumot adtunk a három részre osztott reakcióelegyhez, majd a cink elvonásával (100 µM 1,10-fenantrolinnal (specifikus Zn²⁺ kelátor), 20 perc, 25°C) indukáltuk a 26S proteaszóma újbóli összeszerelődését. A nagy moláris feleslegben alkalmazott rekombináns fehérjék beépülését az endogén p54 helyére kitin-affinitástisztítással ellenőriztük úgy, hogy az eluált frakciókban immunoblottal megvizsgáltuk a 26S proteaszóma jelenlétét.

3. anti-Flag[®] M2-affinitáskromatográfia. Az Anti-Flag[®] M2 agarózhoz (Sigma-Aldrich) kötött Flag-Rad23 és Flag-Dsk2 rekombináns fehérjéket 1-1 ml savas glicinnel (0.1 M glicin-HCl pH 3.5) eluáltuk, majd a frakciókat 25-25 µl 1M Tris-HCl (pH 8.0) hozzáadásával neutralizáltuk. Az SDS-PAGE-sel ellenőrzött rekombináns fehérjét tartalmazó homogén frakciókat -80°C-on tároltuk, és később nyulak immunizálásához használtuk.
4. GSH (glutation) kromatográfia (pull-down kísérletek.). A GST-hez (glutation-S-transzferázhoz) fuzionált, baktériumban expresszált rekombináns fehérjéket és csonkolt darabjaikat (15. ábra) glutation-Sepharose (GE Healthcare) oszlophoz kötöttük (30 perc, 25°C, proteaszóma alappufferben) a gyártó utasításainak megfelelően. A proteaszómát és a poliubiquitilált fehérjéket *Drosophila* embrió-extraktum hozzáadásával biztosítottuk (30 perc, 4°C). A oszlophoz kötődött rekombináns fehérjéket és kölcsönható partnereiket 10 mM GSH (redukált glutation; pH=8.0) oldattal eluáltuk. Az eluátumok tartalmát SDS-PAGE után Coomassie-kék festéssel, valamint immunoblottal anti-ubiquitin (15. ábra), illetve anti-26S proteaszóma (15. és 32A. ábra) ellenanyag-keverékkel (p54, p48A, p42A, p39A és CPα7) vizsgáltuk külön-külön.

Fehérjék elektroforetikus elválasztása, festés és immunoblot

1D-SDS-PAGE. Kísérleteinkben a fehérjék denaturáló poliakrilamid gélen (SDS-PAGE) történő frakcionálását a klasszikus nátrium-dodecil szulfát (SDS) alapú Laemmli-féle módszerrel végeztük¹⁶⁶. A méret alapján elkülönített fehérjéket ezüst-nitráttal festettük¹⁶⁷, amely kevésbé

kvantitatív, mint a kolloidális Coomassie-kék alapú módszer, de sokkal érzékenyebb (néha Coomassie-kék festést is alkalmaztunk).

2D-IEF-SDS-PAGE. Az kétdimenziós, izoelektromos fókuszálással kapcsolt SDS-PAGE azonos méretű, de eltérő fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkező fehérjék elválasztására alkalmas technika. A Strep-affinitáskromatográfiával frakcionált vizsgálandó fehérjéket tovább tisztítottuk 'ReadyPrepTM 2-D Cleanup Kit' (Bio-Rad) segítségével a gyári protokollnak megfelelően. A kicsapott fehérjéket speciális 2D rehidrációs pufferben oldottuk fel (7M urea; 2M thiourea; 4 % (g/v) CHAPS; 50mM DTT; 2 % (g/v) IPTG puffer pH 3-10 vagy pH 3,5-5,0; 0,002 % (g/v) brómfenolkék) (Bio-Rad). A kapott mintát rehidrációs módszerrel szilárd gélcsíkra (pH 3-10 gradiens, 18 cm hosszú, ImmobilineTM DryStrip) (Amersham Biosciences) vittük fel. A MultiphorTM II lapos ágyú elektroforetikus tápegységet (Pharmacia Biotech) használtuk a fehérjék izoelektromos fókuszálásához. A gélcsíkban elválasztott fehérjéket egy tömörítőgél mentes, denaturáló poliakrilamid gélben tovább frakcionáltuk. A fehérjéket immunoblottal és ezüst festéssel tettük láthatóvá.

Immunoblot. A fehérjék specifikus kimutatását immunoblot technikával végeztük. Az SDS-PAGE során frakcionált fehérjéket a gélből nagy kötőkapacitású polivinilidén-fluorid (PVDF - Millipore) membránra transzferáltuk az általános Western-blot protokollnak megfelelően¹⁶⁵. A filter szabadon maradt fehérjekötő felületét blokkoltuk (5 %-os (g/v) tejpor-oldatban áztatva 30 percig 25°C-on), majd a membránt TBST (TBS és 0,05% Tween 20 detergens) pufferben alaposan mostuk. Ezt követően a filtert a vizsgálandó fehérjére specifikus, megfelelően hígított, elsődleges ellenanyag oldatában inkubáltuk (1 óra, 25°C), mostuk 3x15 percig TBST-ben, majd újabb 1 órán át kezeltük az elsődleges ellenanyagra specifikus, torna-peroxidázzal (HRP – horseradish peroxidase) konjugált másodlagos ellenanyaggal. Kemilumineszcens szubsztrát (Millipore) és hidrogén-peroxid jelenlétében a torna-peroxidáz aktivitását fotonkibocsátás jelzi, amit fényérzékeny RTG-film segítségével detektáltunk.

Alkalmazott ellenanyagok

A 26S proteasóma alegységekre specifikus monoklonális-, valamint a 20S partikulumra, a glikogén-foszforilázra, a β -importinra és a p54-NTF-re specifikus poliklonális ellenanyagokat a

csoport korábbi munkái során készítette¹⁶⁸. Az anti-ubiquitint a Dako cégtől vásároltuk. Az anti-Rad23 és anti-Dsk2 poliklonális ellenanyagokat, affinitáskromatográfiával tisztított Rad23 és Dsk2 rekombináns fehérjékkel immunizált nyulakban termeltettük standard módszerrel. A felhasznált ellenanyagokat a 2. táblázat foglalja össze.

Antigén neve	Ellenanyag neve	Termelő faj
p54	28	Egér - mAt
	170	Egér - mAt
	439	Egér - mAt
p54-NTF	α -RSA #1	Nyúl - pAt
p48A	12A1	Egér - mAt
p42A	9E3	Egér - mAt
p42C	123	Egér - mAt
p39A	50	Egér - mAt
CP komplex	α -CP pAt	Nyúl - pAt
CPa7 alegység	α -CP mAt	Egér - mAt
Glikogén foszforiláz	α -p94	Nyúl - pAt
β-importin	α -Ketel	Nyúl - pAt
Ubiquitin	α -ubiquitin	Nyúl - pAt
Rad23	α -Rad23	Nyúl - pAt
Dsk2	α -Dsk2	Nyúl - pAt
Flag-epitóp	α -FlagM ₂	Egér - mAt

2. táblázat. A kísérletekben használt monoklonális- (mAt) és poliklonális (pAt) antitestek felsorolása.

Fehérjeazonosítás MALDI-TOF tömegspektrometriai módszerrel

A tömegspektrometriai analízishez az ezüsfestéssel¹⁶⁹ kimutatott fehérjefoltokat a poliakrilamid gélből kivágtuk, majd 50%-os (v/v) acetonitrilben oldott 25mM NH₄HCO₃-tal equilibráltuk. A diszulfid-hidakat DTT-vel redukáltuk (30 perc, 65°C) és jódiacetamiddal alkiláltuk (30 perc, 25°C). Az azonosítandó fehérjék gélen belüli triptikus emésztését (sertés tripszinnel (Promega)) követően az extrahált emésztési termékeket C18 ZipTip (Millipore) oszlopon frakcionáltuk. A tömegspektrometriai analízist Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométerrel (Bruker) végeztük. A tömegspektrogramm értékeit a ProteinProspector szoftvercsomag MS-Fit programjának segítségével az NCBI adatbázissal összehasonlítva azonosítottuk a vizsgált fehérjét.

EREDMÉNYEK

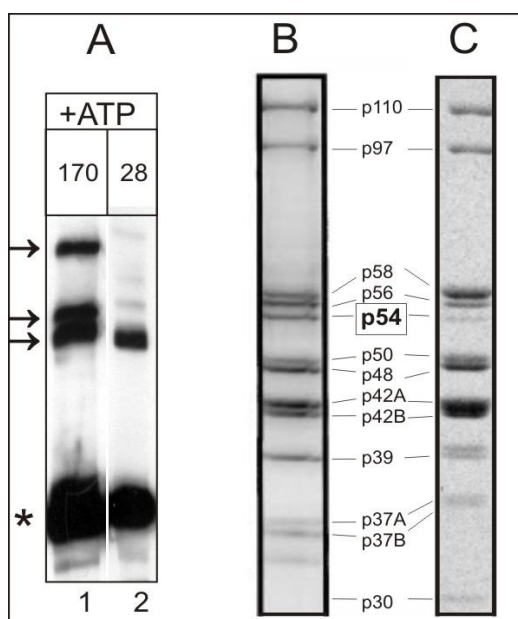
A különleges alegység: p54

Az elmúlt évtizedben az Udvardy-labor rengeteg tudást halmozott fel a *Drosophila* 26S proteasóma p54 poliubiquitin receptorával kapcsolatban. Korábbi munkák során klónozták, feltérképezték az UIM-ait, ellenanyagokat termeltettek ellene, elhelyezték a proteasómán belül és igazolták a nélkülözhetetlenségét. Később (itt csatlakoztam a csoporthoz) kimutattuk⁹⁸, hogy képes leválni és visszaépülni a 26S proteasómába, ami a p54-nek, mint ingázó faktornak valamilyen extraproteasómális szerepét és/vagy funkcióját feltételezi. A jelenség mechanizmusáról és biológiai jelentőségéről akkor még csak keveset tudtunk, elméleteinket, melyek inkább feltételezések voltak, csupán *in vitro* kísérletek adatai alapján állítottuk fel. Doktoranduszként izgatni kezdett az a kérdés, hogy miként és miért játszódik le a sejtben a p54 ingázása, ezért az egyik fő kutatási témámnak a fenti jelenség értelmezését választottam. A korai kísérletek két nagyon meglepő eredményt hoztak, amelyek az eredeti problémáról elterelve a figyelmünket egy új biológiai jelenségre mutattak rá, ami az ingázás lehetséges mechanizmusának és a p54 extraproteasómális szerepének megértéséhez, valamint jelen dolgozat megszületéséhez vezettek.

Az első furcsa megfigyelést a *Drosophila* 19S regulátor komplex (RC) térszerkezetének vizsgálata során nyertük, amikor a RC-en belül elhelyezkedő, egymással kölcsönható alegységek térképezését fehérje keresztkötő szerekkel vizsgáltuk. ATP jelenlétében, amikor az összes RC a 26S proteasómában van (nincs jelen szabad RC), eltérő keresztkötési mintázatot észleltünk a p54 alegységre specifikus két monoklonális ellenanyaggal (170 és 28). A 170-es három, míg a 28-as monoklonális ellenanyag csak egy p54-immunoreaktív keresztkötési terméket ismert fel (12A. ábra). Ez a kísérleti eredmény azt jelezte, hogy a p54 két különböző konformációban van jelen a 26S proteasómán belül, s e két konformációt a monoklonális ellenanyagok specifikusan felismerni képesek. Mivel a két ellenanyag különböző, de egymáshoz nagyon közeli epitópot ismer fel a p54 C-terminális felében (11. ábra, 2. táblázat), arra következtettünk, hogy ATP jelenlétében olyan pl. poszttranszlációs modifikáció okozta konformációváltozás játszódik le a 26S proteasóma RC-hez kötött p54 alegységben, aminek következtében a 28-as ellenanyag

epitópja rejtett állapotba kerül. A fenti eredmény azt sugallta, hogy a p54 egy dinamikusan változó molekula a *Drosophila* proteaszómában.

A másik megfigyelés is egy érdekes kérdést vetett fel. Ha 26S proteaszómát preparáltunk embriók és korai lárvák kevert extraktumából, akkor a p54 szubsztöchiometrikus alegységként jelent meg a denaturáló gélen elválasztott és Coomassie-kékkel festett 19S regulátor komplexumban (12C. ábra) – a többi alegységnél kevesebb p54-et lehetett kimutatni. Ezzel szemben a homogén embrió-extraktumból preparált 19S regulátor komplexumnak a p54 sztöchiometrikus alegysége volt. (12B. ábra).



12. ábra. A p54 két különböző konformációban van jelen a proteaszómában, a RC p54 mennyisége pedig különböző az embrió és az embrió-lárva extraktumokban.

(A) Kémiai keresztkötést követően a p54-specifikus 170-es és 28-as monoklonális ellenanyagok különböző keresztkötési termékeket ismernek fel (→). * -monomer (nem keresztkötött) p54.

(B) A homogén embrió-, valamint (C) az embrió- és korai lárvák vegyes extraktumából tisztított 19S regulátor komplex alegység összetétele 10% SDS-PAGE és Coomassie-kék festést követően. Az embrió-lárva extraktumban a **p54** a 19S regulátor komplex szubsztöchiometrikus alegysége.

Mi okozhatta a proteaszómához kötött p54 koncentrációjának csökkenését az embrió-lárva vegyes extraktumban, és ez miért nem mutatható ki a homogén embrió-extraktumban? A legkézenfekvőbb magyarázat erre az volt, hogy a lárvákban történik valamilyen változás, minek hatására a proteaszóma p54-tartalma lecsökken. Mivel mindkét minta esetében a preparálást azonos körülmények között végeztük, kizárhattuk annak lehetőségét, hogy a p54 a hosszadalmas tisztítás során elveszett volna az embrió-lárva extraktumból. Habár korábbi kísérleteinkből tudtuk, hogy embrióban a p54-nek egy kis százaléka szabad formában is megtalálható, ami Superose 6 frakcionálással jól elkülöníthető a 26S proteaszómától (14A. ábra), nem volt adatunk a lárvális p54 szabad/kötött formájának arányáról. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a lárvális korszakban vagy megnő a szabad p54 koncentrációja, ami nem jelenik meg a 26S

proteaszóma Superose 6 csúcsfrakciókban, vagy a proteaszómához kötött p54 valamilyen (embrióban gátolt) mechanizmus révén eliminálódik. Ennek eldöntése céljából 15 különböző szinkronizált fejlődési stádiumból készített nyers fehérjeextraktum p54 mennyiségét (szabad és proteaszómához kötött) meghatározó kísérletek elvégzését terveztük.

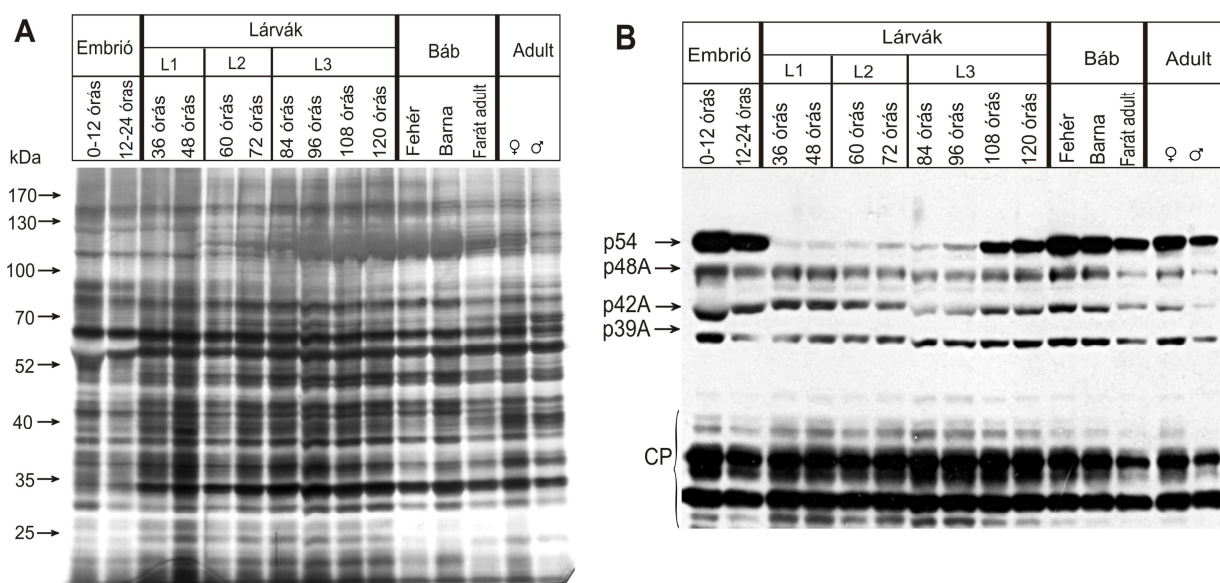
A poliubiquitin receptorok sorsa az egyedfejlődés folyamán

A p54 alegység sorsának nyomon követése érdekében szinkronpetéztetéssel létrehozott 15 különböző fejlődési állapotból gyűjtött biológiai minta analízisét végeztük el. A nőstények petézésének szinkronizálására azért volt szükség, hogy az egyedfejlődési stádiumokon belül az állatok kronológiai és morfológiai kora biztosan azonos legyen. Habár az állatok fejlődési stádiumát és annak pontos szakaszát specifikus morfológiai bélyegek¹⁷⁰ alapján is meghatároztuk, kísérleteinkben a biológiai anyagot főleg a pete lerakásától eltelt idő (órában) és a fő stádiumokra jellemző bélyegek alapján kategorizáltuk; ezzel biztosítva a kísérletek reprodukálhatóságát. Így hoztunk létre két vegyes korú, vad típusú embrió csoportot (E0-12 és E12-24 órás), melyek lefedték a teljes, 1 napig tartó embrionális korszakot, két korai lárva (L1-36 és L1-48 órás), két második stádiumos lárva (L2-60 és L2-72 órás), két korai és két kései harmadik stádiumos lárva (L3-84 és L3-96, valamint L3-108 és L-120 órás), három báb (fehér- és barna báb, valamint farát adult – legutolsó bábstádium) és két korai adult (nőstény és hím) csoportot. A mintákat proteaszóma alappufferben feltártuk, SDS-mintapufferben azonnal felforraltuk, majd denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel és ezüstfestéssel megbecsültük összfehérje tartalmukat. A normálást annak érdekében végeztük, hogy a 15 különböző fejlődési stádiumból származó preparátumok proteaszóma alegységtartalma összehasonlítható legyen. A normálás során megállapított hozzávetőleges mennyiségű összfehérjét tartalmazó mintákat 9 %-os denaturáló poliakrilamid gélben megfuttattuk és ezüstfestéssel ellenőriztük (13A. ábra). Néhány fejlődésstádium-specifikus proteintól eltekintve, a gélre felvitt anyagok fehérjetartalmát azonosnak vettük. A normálást nem csak ezüstfestéssel, hanem belső kontrollokra (pl. glikogén foszforiláz) fajlagos immunoblottal is elvégeztük (nem bemutatott eredmény).

A gélelektroforézist azonos mintamennyiségekkel megismételtük, majd a fehérjéket PVDF- membránra blottoltuk. A 26S proteaszóma jelenlétét és alegységösszetételét az egyes fejlődési stádiumokban olyan ellenanyagok keverékével vizsgáltuk, melyek specifikusan

felismerik a 19S regulátor komplex bázisának egy- (p48A – ATPáz) és fedelének két alegységét (p42A és p39A), a p54-et, valamint a 20S partikulumot – ez az általánosan alkalmazott kombináció a strukturálisan és funkcionálisan aktív 26S proteaszóma kimutatására alkalmas. A p54 immunodetektálására három, a p54 C-terminálisán található, különböző epitópot felismerő monoklonális ellenanyagot használtunk (2. táblázat, 11. ábra).

A 13B. ábra szerint a p54 mennyisége az egyedfejlődés lárvális szakaszában, az embrióból történő kibújást követően specifikusan, hirtelen és drasztikusan lecsökkent. A p54 koncentrációja alacsony maradt három napon át, egészen a kései, vándorló lárvastádiumig, majd lassan emelkedni kezdett és végül a báb stádiumra visszaállt az eredeti, az embriókorban megfigyelt szintjére, amit az adult korban is megtartott. A különböző alegységek relatív mennyiségének összehasonlításából következtethetünk az egyes fejlődési stádiumokban bekövetkező változásokra. A 13B. ábra tanúsága szerint csak a p54 koncentrációja változott, míg a 19S regulátor komplex és a 20S proteaszóma vizsgált alegységeinek relatív mennyisége állandó maradt az egyedfejlődés különböző szakaszaiban.

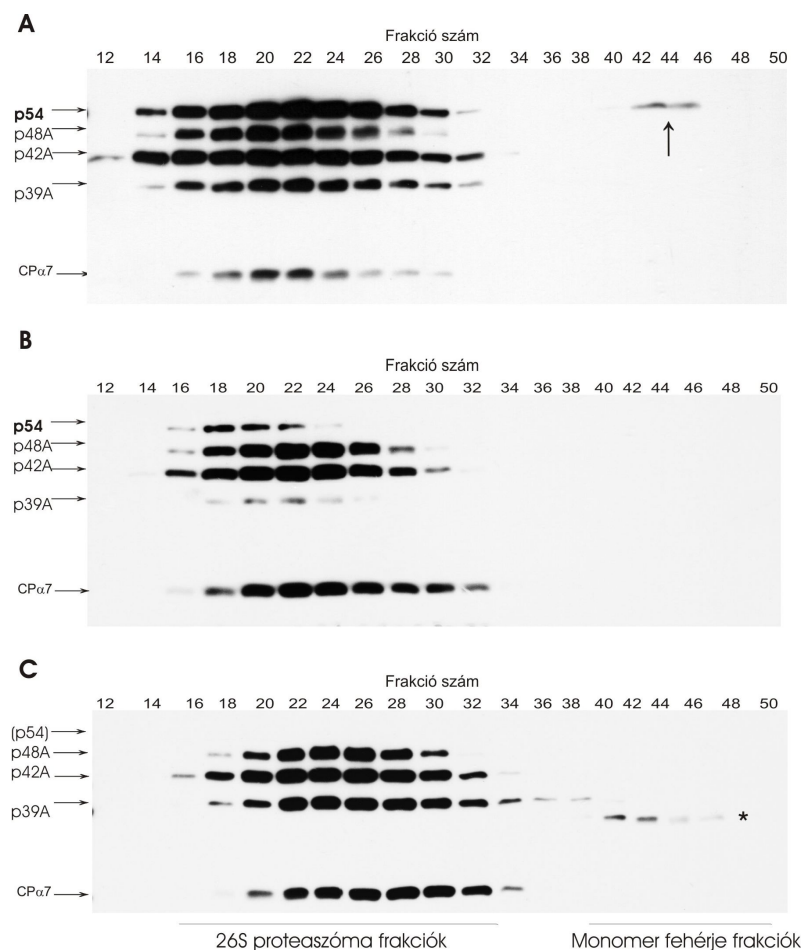


13. ábra. A p54 alegység szelektíven eliminálódik az egyedfejlődés lárvális stádiumaiban.

(A) Különböző fejlődési stádiumokból preparált, nyers fehérjeextraktumok ezüsfestett képe (9 % SDS-PAGE). (B) A 13A. kísérletben alkalmazott minták immunoblot analízise, melyben a p54, p48A (bázis), p42A és p39A (fedél) alegységekre fajlagos monoklonális-, valamint a 20S partikulumra specifikus poliklonális ellenanyagok keverékét használtuk. A p54 alegység koncentrációja specifikusan lecsökken a korai lárvastádiumokban (36, 48, 60, 72, 84 és 96 óras).

Mivel a fenti kísérletben nyers fehérjeextraktumokat használtunk, az eredmény alkalmas volt azon feltételezés kizárására is, miszerint a 12C. ábrán bemutatott embrió-lárva vegyes extraktumból homogenitásig tisztított 19S regulátor komplex p54 koncentrációjának csökkenése a szabad p54 (melyet a gélszűrés során elkülönítettünk a proteaszómától) feldúsulásának következménye lenne. Hogy további bizonyítékot szerezzünk, vad típusú embriókból (14A. ábra), 36, 48, 60, 72, 84, 96 és 108 órás vegyes- (14B. ábra), valamint 60 órás homogén (14C. ábra) lárvákból készített fehérjeextraktumot natív állapotában Superose 6 oszlopra töltöttük (külön-külön), és gélszűrési kromatográfiával elkülönítettük a 26S proteaszómát a monomer, szabad fehérjétől. A kapott frakciókat megfuttattuk 9 %-os denaturáló poliakrilamid gélen, majd a p54, p48A (bázis), p42A és p39A (fedél), valamint a 20S proteaszóma $\alpha 7$ (CP $\alpha 7$) alegységekre specifikus monoklonális antitestek keverékével immunoblotot végeztünk.

A 14A. ábrán jól látható, hogy az embrióban a p54 a proteaszómához kötött formájában dominál, és csak nyomokban mutatható ki az extraproteaszómális frakciókban (14A. ábra:↑). Ezzel szemben a kevert lárva extraktumában a p54 a proteaszóma frakciókban csak nyomokban, míg a monomer fehérjék között egyáltalán nem mutatható ki (14B. ábra). Ebből a megfigyelésből azt a következtetést vontuk le, hogy a lárvális stádiumban aktiválódik egy mechanizmus, ami a proteaszómához kötött és a szabad p54-et egyaránt eliminálja. Az elimináció erőssége a lárvális stádiumokban eltérő, hiszen ha csak a 60 órás homogén lárva preparátumával végeztük el a gélszűrést, nem lehetett kimutatni p54-et egyik frakcióban sem (14C. ábra). Ha alaposan megvizsgáljuk a 14. ábrát, jól látható, hogy a lárvális 26S proteaszóma (19S+20S) későbbi frakciókban eluálódik (14B. és 14C. ábra), mint az embrió 26S proteaszóma (14A. ábra). Míg az embrióból tisztított komplexum már a 14. frakciótól kimutatható, és a csúcsa a 20-22. frakciókban van, addig a lárvákból (különösen a 60 órásból) tisztított proteaszóma (14B. és 14C. ábra) csak a 16.-tól jelenik meg, és a csúcsa a 22-24. frakciókban van. Ez a jelenség újabb bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a lárvákból a 26S proteaszóma exponáltan elhelyezkedő alegysége, a p54 hiányzik, aminek következtében a proteaszóma mérete és alakja, és ebből következően természetesen a migrációs (és talán a működési) tulajdonsága is megváltozott.



14. ábra. A 26S proteaszóma és a monomer fehérjék elkülönítése Superose 6 gélzsűrési kromatográfiával.

(A) Embrió-, (B) 36, 48, 60, 72, 84, 96 és 108 órás vegyes- és (C) 60 órás homogén lárva nyers fehérjeextraktum Superose 6 frakcióinak immunoblot analízise 9 % SDS-PAGE-t követően, p54, p48A (bázis), p42A és p39A (fedél), valamint CPα7 alegységekre specifikus monoklonális ellenanyagok keverékével. A lárvális 26S proteaszóma p54 tartalma (és a szabad p54 koncentráció is) drasztikusan lecsökken, ami a proteaszóma kromatográfiás viselkedését is befolyásolja. ↑ - szabad p54; * - a p39A degradációs terméke.

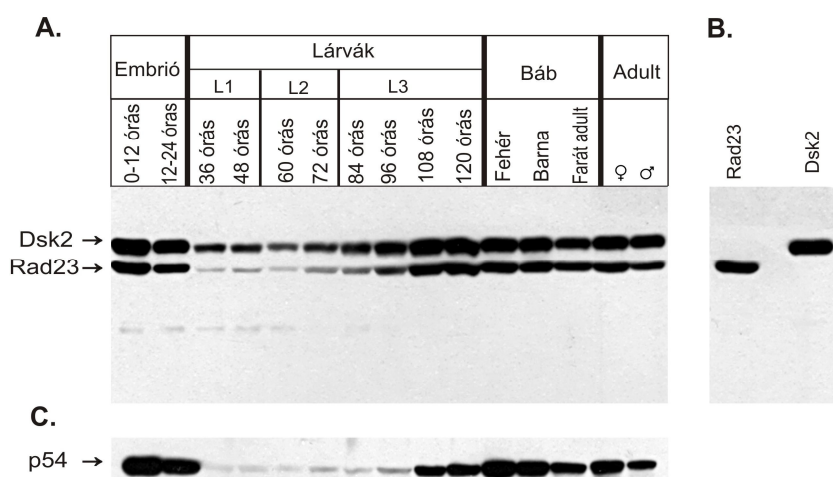
A p54 poliubiquitin receptor koncentrációjának ilyen mértékű csökkenése a lárvális stádiumokban a többi poliubiquitin receptor túltermelődését feltételezi. Korábbi kísérleteinkben szerkezeti és szekvencia homológia alapján a FlyBase és az NCBI adatbázisokat használva megkerestük, majd klónoztuk az élesztő poliubiquitin receptorok *Drosophila* ortológjait: a három UBA/UBL fehérjét (Rad23, Dsk2 és Ddi1) és a Pru-domént tartalmazó proteaszóma alegységet (Rpn13/p42E). GST-hez fuzionált rekombináns (teljes hosszúságú és csonkolt) fehérjéket használva *in vitro* kromatográfiás (pull-down) kísérletekben feltérképeztük a receptorok tényleges funkcionális egységeit, a proteaszómával és a poliubiquitilált fehérjékkel kölcsönható szakaszait. Habár a „pull-down” kísérletek érdekes megfigyelésekhez vezettek, hosszadalmas és

mindenre kiterjedő részletezésük helyett egy összefoglaló sematikus ábrán mutatom be a fontosabb eredményeket (15. ábra). Hamar kiderült, hogy *Drosophilában* a p42E proteaszóma alegység nem, a Ddi1 pedig csak nagyon kis affinitással köti a poliubiquitilált fehérjéket. Megállapítottuk, hogy míg a Ddi1 nem dokkolt a 26S proteaszómához, addig a Rad23 és Dsk2 mind a proteaszómát (UBL-doménjükkel), mind pedig a poliubiquitilált szubsztrátokat (UBA-doménjükkel) nagy affinitással kötötték. A p54-, Rad23- és Dsk2-csendesítő RNS-interferencia transzgénikus muslicákban a poliubiquitilált fehérjék nagyfokú felhalmozódása (nem bemutatott eredmény), valamint a fenti *in vitro* kísérletek eredményei alapján megállapítottuk, hogy muslicában a p54-en kívül a két fő poliubiquitin receptor a Rad23 és Dsk2, ezért a további kísérleteinkben már csak ezeket vizsgáltuk.

GST-fuzionált rekombináns fehérje	1 135 275 415 550 as	<i>In vitro</i> interakció	
		26S proteaszóma	pUb-fehérjék
Dm Dsk2	UBL [] UBA	++++	+++
Dm Dsk2-UBL	UBL []	+++++	-
Dm Dsk2-UBA	[] UBA	-	+++
Dm Rad23	UBL [] UBA1 [] UBA2	++	+++
Dm Rad23-UBL	UBL []	++++	-
Dm Rad23-UBA1-2	[] UBA1 [] UBA2	-	+++
Dm Rad23-UBA1	[] UBA1	-	+
Dm Rad23-UBA2	[] UBA2	-	+
Dm Ddi1	UBL [] UBA	+	+
Dm Ddi1-UBL	UBL []	+	-
Dm Ddi1-UBA	[] UBA	-	+
Dm Rpn13/p42E	[] Pru []	++++	-
Dm p54	vWA [] UIM1 [] UIM2 [] UIM3 []	++	++++
Dm p54-NTF	vWA []	+++++	-
Dm p54-CTF	[] UIM1 [] UIM2 [] UIM3 []	-	+++

15. ábra. A *Drosophila* poliubiquitin receptor-domének funkcionális térképezése *in vitro* pull-down kísérletekkel. A GST-hez fuzionált (csonkolt) fehérjék proteaszómához és poliubiquitilált fehérjékhez való affinitását +/- jelöli. Az affinitás erőssége +/++/++++/+++++/+++++ irányba nő. **UBL** – ubiquitin-szerű domén; **UBA** – ubiquitinnel asszociáló domén; **Pru** – pleckstrin-szerű ubiquitin receptor domén; **vWA** – von Willebrand-A faktor domén; **UIM** – ubiquitin interakciós motívum. A *Drosophila* fő poliubiquitin receptorai a p54, Rad23 és Dsk2.

A fenti elképzelésnek megfelelően megvizsgáltuk, hogy a p54 eliminálódásával párhuzamosan megnő-e a Rad23 és Dsk2 fő extraproteasómális poliubiquitin receptorok mennyisége a lárvális stádiumokban? Ehhez a már ismertetett 15 fejlődési stádiumból készített (a 13A. ábrának megfelelő mennyiségű) fehérjemintát megfuttattuk poliakrilamid gélen, blottoltuk, majd a Rad23-ra és Dsk2-re specifikus, nyulakban termeltetett poliklonális ellenanyagok keverékével immunreakciót végeztünk. Meglepetésünkre a p54-hez hasonlóan (16C. ábra) a Rad23 és Dsk2 mennyisége is hirtelen lecsökkent a korai lárvákban közvetlenül az embriókor végén, és alacsony maradt egészen a korai harmadik stádiumos lárvakorig (16A. ábra). Az eredeti koncentrációjukat a 84-96 órás L3-ban (korábban, mint a p54 (108-120 órás L3)) nyerték vissza.

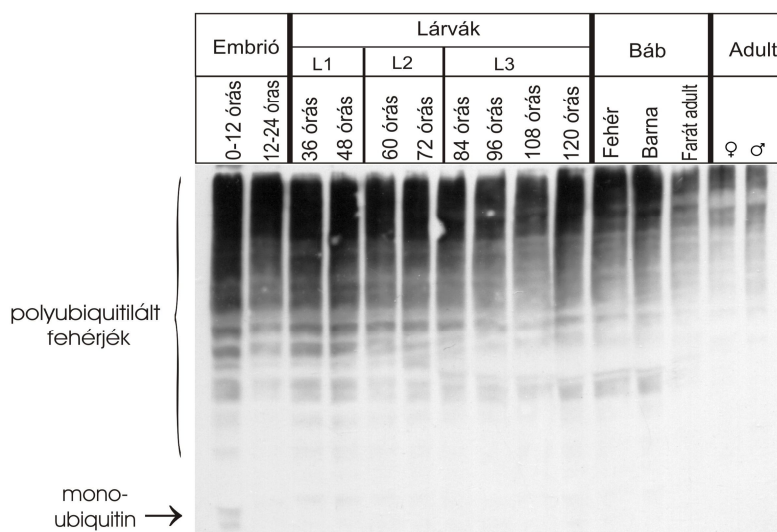


16. ábra. A Rad23 és Dsk2 UBA/UBL poliubiquitin receptorok mennyisége látványosan lecsökken az egyed-fejlődés lárvális szakaszában.

(A) A 15 fejlődési stádiumból preparált, azonos fehérjetartalmú összfehérje-extraktum immunoblot analízise Rad23 és Dsk2 fehérjékre specifikus poliklonális ellenanyagok keverékével. (B) A Rad23 és Dsk2 ellenanyagok specificitásának bizonyítása: embrió-extraktumban a kétféle ellenanyag specifikusan egy-egy csíkot ismer fel. (C) a 13B. ábra p54 fejlődési profilját tartalmazó metszete.

Ezek után azt feltételeztük, hogy a poliubiquitilált fehérjék, párhuzamosan a fő poliubiquitin receptorok (p54, Rad23 és Dsk2) mennyiségének drasztikus csökkenésével felhalmozódtak az érintett lárvák sejtjeiben. Hogy ezt megvizsgáljuk, a 15 különböző fejlődési stádiumból készített mintát újra megfuttattuk denaturáló poliakrilamid gélen, majd immunoblotot végeztünk anti-ubiquitin ellenanyaggal, amely a poliubiquitin-láncot nagy affinitással ismeri fel. Szemben azzal a ténnyel, hogy a lárvákban csak nyomokban vannak poliubiquitin receptorok, a

polyubiquitilált fehérjeszubsztrátok mégsem halmozódtak fel (17. ábra). A disszertációban nem részletezett kísérleteink alapján ezt a látszólagos paradoxont ma úgy magyarázzuk, hogy a lárvális stádiumokban aktiválódik egy sor rendkívül ellenálló, kompakt szerkezetű, lárvaspecifikus proteáz, melyek az irreverzibilisen denaturált fehérjék (és a polyubiquitin receptorok) eltávolításáért felelnek.



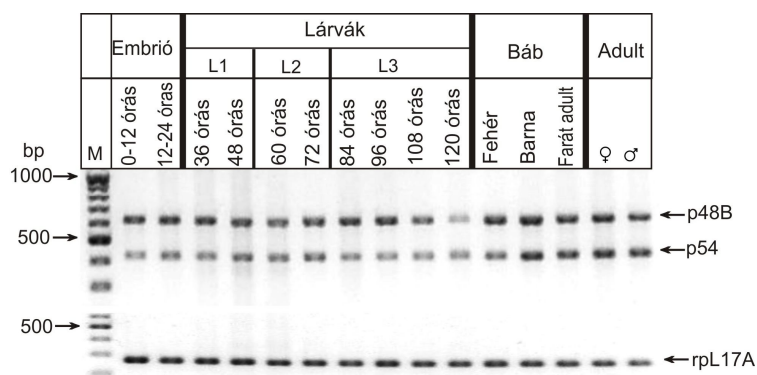
17. ábra. A polyubiquitilált fehérjék nem halmozódnak fel a lárvális stádiumokban.

A 15 különböző fejlődési stádiumból preparált összfehérje-extraktum immunoblot analízise ubiquitin elleni poliklonális ellenanyaggal. A polyubiquitilált szubsztrátok nem halmozódnak fel a lárvastádiumokban annak ellenére sem, hogy receptoraik eliminálódtak (16. ábra).

A polyubiquitin receptorok degradálódnak az egyedfejlődés korai lárvális szakaszában

A p54, Rad23 és Dsk2 polyubiquitin receptorok mennyisége a lárvális stádiumokban látványosan lecsökken. Felmerült hát a kérdés, hogy a szabályozás kizárólag fehérjeszinten, azaz proteolízissel történik, vagy valamilyen transzlációs gátlásról, esetleg a három gén (*Pros54* – p54; *Rad23*; *Ubiquilin* – Dsk2) expressziójának csökkenéséről van szó? Ennek eldöntésére szemikvantitatív reverz transzkripcióval kapcsolt PCR-t (RT-PCR) végeztünk. Első lépésben a 15 különböző fejlődési állapotban gyűjtött biológiai mintákból össz RNS-t preparáltunk, amelyből cDNS könyvtárakat készítettünk. A normálást követően (a bemérési kontroll az L17 riboszóma protein cDNS-e) a 15 cDNS könyvtárat templátként használva, p54-et és p48B-t (26S

proteasóma ATPáz alegység - belső kontroll) kódoló exonokra specifikus oligonukleotid primerek segítségével PCR-t végeztünk, majd a szintetizálódott cDNS-ek mennyiségét 2 %-os agaróz gélelektorforézissel ellenőriztük. A 18. ábra tanúsága szerint a p54-et kódoló transzkriptum szintjében nem mutatható ki drasztikus csökkenés egyik fejlődési állapotban sem. Ezután megvizsgáltuk a p54-et és a p48B-t kódoló transzkriptumok egymáshoz viszonyított relatív arányát (p54/p48B), ami az embriókorban tapasztaltakhoz képest nem változott (jelentősen) a korai és a kései lárvastádiumokban sem. A báb- és adult korban a p54-et kódoló mRNA koncentrációja kissé megnőtt eltolva ezzel a p54/p48 arányát. Habár erre a jelenségre nem tudunk magyarázattal szolgálni (valójában nem vizsgáltuk meg részletesebben), a kísérletből egyértelműen kiderült, hogy a *Pros54* expressziója nem csökken az egyedfejlődés lárvális szakaszaiban, azaz a p54 poliubiquitin receptor mennyisége kizárólag fehérjeszinten szabályozódik a lárvastádiumokban.

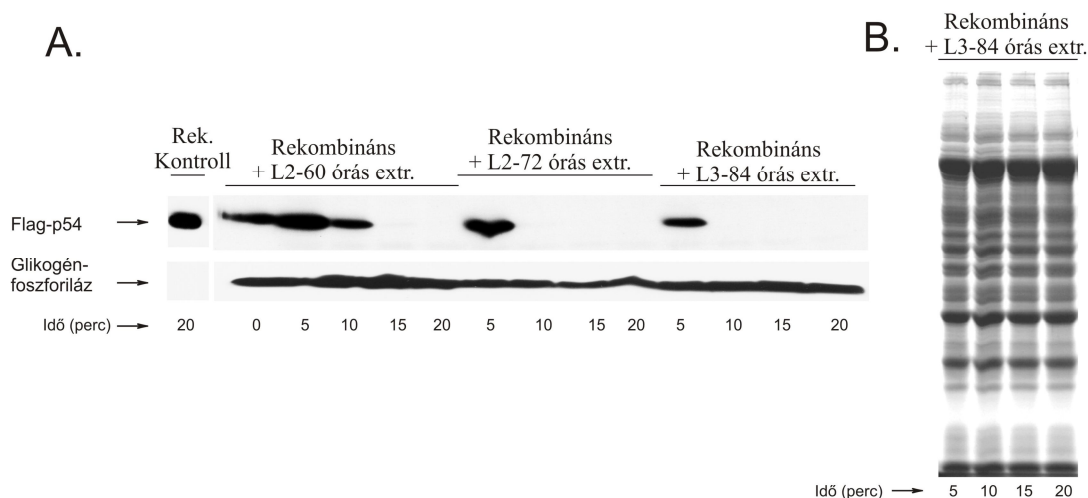


18. ábra. Szemikvantitatív RT-PCR. A *Drosophila melanogaster* 15 különböző fejlődési állapotában megvizsgáltuk a p54 és egy belső kontroll, a p48B fehérjét kódoló transzkriptumok mennyiségének változását. A p54-et kódoló mRNA szinte nem változik a lárvastádiumokban, ami arra utal, hogy a p54 koncentrációjának csökkenése proteolitikusan, nem pedig transzkripcionálisan szabályozott. p54 amplikon – 419 bp; p48B amplikon – 610 bp; rpL17A amplikon 268 bp (bemérési kontroll).

A Rad23-ra és Dsk2-re specifikus primerekkel végzett RT-PCR a p54-hez hasonló eredményt hozott (nem bemutatott eredmény). Összevetve eredményeinket a FlyBase adatbázisban nemrégiben megjelent, minden annotált génre kiterjedő microarray-alapú fejlődési profil adataival¹⁷² nagy biztonsággal kijelenthetjük, hogy a *Drosophila* egyedfejlődése során a p54, Rad23 és Dsk2 poliubiquitin receptorok mennyisége nem transzkripcionálisan szabályozott.

Vizsgálataink szerint a fehérjeszintű szabályozás nem a transzláció gátlásának, hanem egy specifikus proteolitikus aktivitás lárvális stádiumban történő megjelenésének következménye. A

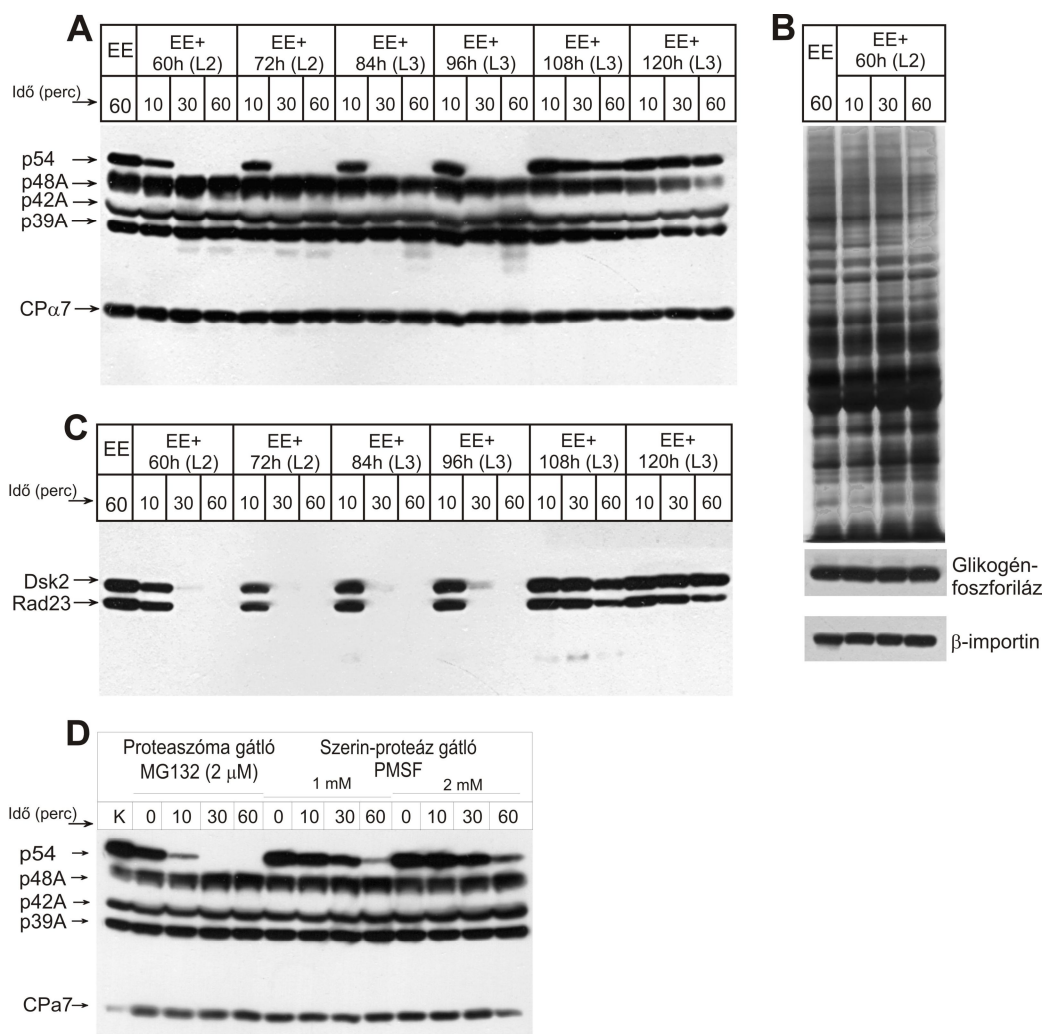
specifikus proteolitikus szabályozás feltétele, hogy egy kiemelt fejlődési pillanatban és/vagy egy adott sejtben csak néhány fehérje lebontása történjen meg, miközben a többi fehérje intakt maradjon. A poliubiquitin receptorok lárvakorban bekövetkező fajlagos degradálódásának igazolására a következő *in vitro* kísérletet végeztük el. Baktériumban termeltetett rekombináns Flag-p54 fehérjét adtunk három különböző korú szinkronizált lárvacsoportból (L2-60, L2-72 és L3-84 órás) preparált natív fehérjeextraktumhoz, inkubáltuk 5, 10, 15 és 20 percig (25°C-on), majd a reakciót SDS-mintapuffer hozzáadásával és 5 perces forralással leállítottuk. A mintákat 10 %-os denaturáló poliakrilamid gélen megfuttattuk, majd anti-Flag és anti-glikogén-foszforiláz (belső kontroll – háztartási géntermék) ellenanyag-keverékkel immunoblotot végeztünk. A lárváextraktumokhoz adott rekombináns monomer Flag-p54 fehérje 10-15 perc leforgása alatt kvantitatíve lebomlott, ám a belső kontrollként használt glikogén-foszforiláz (ami a lárvából származott) teljesen intakt maradt (19A. ábra). Lárvális fehérjék nélkül azonban a Flag-p54 sem degradálódott (19A. ábra: Rek. kontroll). A 19B. ábrán (Coomassie-kék festés) jól látható, hogy az inkubáció során a bakteriális és lárvális fehérjék zöme (nem csak a glikogén-foszforiláz) sértetlen maradt, azt bizonyítva, hogy a lárvastádiumokban aktiválódik egy p54-re specifikus proteolitikus rendszer.



19. ábra. A lárvá fehérjeextraktumhoz adott Flag-p54 szelektíven lebomlik.

(A) A különböző korú (60, 72 és 84 órás) lárvák fehérjeextraktumával inkubált Flag-p54 (baktériumban termeltetett) szelektíven lebomlott, míg a belső kontrollként használt (lárvális) glikogén-foszforiláz nem. Lárvális fehérjék hiányában a Flag-p54 is sértetlen maradt (Rek. kontroll). (B) A p54-specifikus proteáz szelektivitását az is bizonyítja, hogy az inkubációs időkben a bakteriális és lárvális fehérjék zöme intakt maradt (10 % SDS-PAGE Coomassie-kék festés).

A fenti *in vitro* megfigyelésből kiindulva arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a 26S proteaszómához kapcsolódott endogén p54-et képes-e lebontani az ismeretlen lárvális proteáz? Ennek eldöntésére olyan 26S proteaszómában gazdag forrást (embrió-extraktumot) választottunk, amiben a p54 döntő többsége a komplexumhoz kötött formában van jelen (14A. ábra). Azonos mennyiségű embrió nyers fehérjeextraktumot (EE) inkubáltunk 60, 72, 84, 96, 108 és 120 órás lárvákból készített összfehérje-preparátummal 10, 30 és 60 percig (25°C). A reakciót leállítottuk, majd a mintákat frakcionáltuk (SDS-PAGE), és a 26S proteaszóma alegységösszetételét specifikus antitestek keverékével immunoblot technikával vizsgáltuk (p54, p48A, p42A, p39A és CP α 7). A 20A. ábrán jól látható, hogy míg a kontrollban (csak embrió-extraktum) a 26S proteaszóma p54 alegysége ép maradt az inkubáció során, addig a 60, 72, 84 és 96 órás lárvá-extraktum hatására szelektíven és gyorsan lebomlott. Mindeközben a többi vizsgált proteaszóma (19S és 20S) alegység és az embrióból és lárvából származó két háztartási fehérje, a β -importin és a glikogén-foszforiláz teljesen intakt maradt (20B. ábra). Ezüstoffestett denaturáló gélen kimutattuk, hogy ehhez hasonlóan az embrionális és lárvális fehérjék zöme is tökéletesen sértetlen maradt, még 60 perces inkubálást követően is (20B. ábra). Amikor a fenti kísérletet megismételtük Rad23- és Dsk2-fehérjékre specifikus ellenanyagok keverékével, kiderült, hogy az embrionális Rad23 és Dsk2 fehérjék is hasonló szelektivitással bomlanak le, mint a p54 (20C. ábra). Ez az eredmény egyértelműen azt sugallta, hogy a három poliubiquitin receptort egy és ugyanazon proteolitikus rendszer távolítja el, amely az egyedfejlődés lárvális korszakában aktiválódik.



20. ábra. A *Drosophila* poliubiquitin receptorok specifikusan degradálódnak a lárvakorban.

Embrió összfehérje-extraktumot (EE) inkubáltunk 60, 72, 84, 96, 108 és 120 órás lárvák összfehérje-preparátumával, majd immunreakciót végeztünk (A) 26S proteaszóma (p54, p48A, p42A, p39A és CPα7) és (C) Rad23/Dsk2 elleni antitestek keverékével. A korai lárvákból származó preparátum szelektíven bontotta a p54, Rad23 és Dsk2 fehérjét, de nem bántotta a proteaszóma többi alegységét, a belső kontrollként használt (B) glikogén-foszfórilázt és β-importint, valamint az embrionális és lárvális fehérjék zömét. (D) A 60 órás lárvák proteáz aktivitását proteaszóma inhibitorral (MG132) nem, de szerin-proteáz inhibitorral (PMSF) gátolni tudtuk. EE-60: csak embrió-extraktum 60 percig inkubálva. K – kontroll (csak embrió-extraktum 60 percig inkubálva)

Az élesztő Rpn10 (a p54 ortológja) alegységéről kiderült, hogy a Hul5 ubiquitin-ligáz jelenlétében poliubiquitilálódik, minek következtében a féléletideje 45 percre csökken¹¹⁴. A rövid féléletidőből arra következtettek, hogy poliubiquitilált Rpn10-et a 26S proteaszóma felismeri és lebontja. Ezek után mi is feltettük a kérdést, hogy vajon a *Drosophila* p54, Rad23 és Dsk2 fehérjék lárvastádium-specifikus degradálódása proteaszóma-függő folyamat-e? Ennek eldöntésére proteolitikusan aktív 60 órás L2 fehérjeextraktumot három egyenlő részre osztottunk,

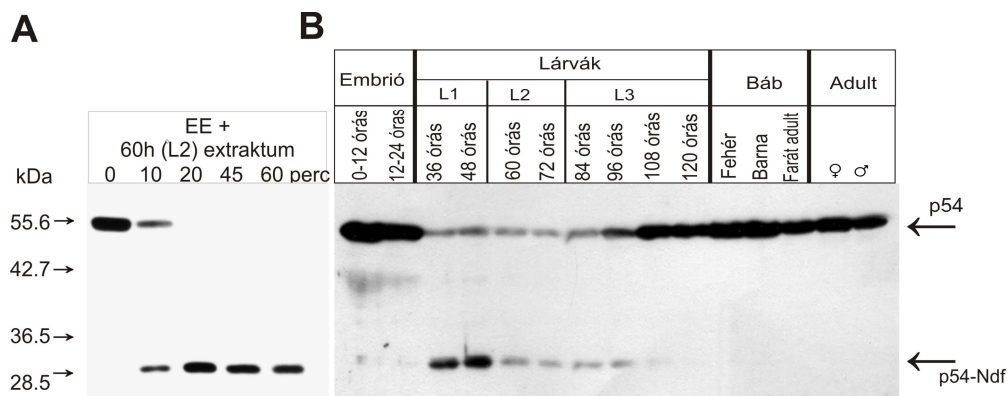
majd proteáz gátlókkal előinkubáltunk (25°C, 20 perc): 2 µM MG132-vel, valamint 1 és 2 mM PMSF-el külön-külön. Míg a PMSF (fenil-metil-szulfonil-fluorid) egy szelektív szerin-proteáz inhibitor, addig az MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO) a 20S proteaszóma kaszpázszerű aktivitását reverzibilisen gátolni képes peptid-aldehyd. Az előkezelt lárva-extraktumhoz embrió összfehérje-preparátumot adtunk (gazdag proteaszóma, Rad23 és Dsk2 forrás), majd 0, 10, 30 és 60 percig (25°C) tovább inkubáltuk. A reakciót forralással leállítottuk, a mintákat megfuttattuk denaturáló gélen, és immunoblotot végeztünk 26S proteaszóma alegységekre specifikus antitestek keverékével. A proteaszómához kapcsolódó endogén p54 alegység szelektív degradációját a 2 mM végkoncentrációban alkalmazott PMSF nagymértékben, míg az MG132 proteaszóma inhibitor egyáltalán nem gátolta (20D. ábra). A Rad23 és Dsk2 fehérjék esetében ugyanezt tapasztaltuk (nem bemutatott eredmény). Tehát *Drosophilában* a p54, Rad23 és Dsk2 poliubiquitin receptorok lárvastádiumban bekövetkező degradációját nem a 26S proteaszóma, hanem valamilyen szerin-proteázok katalizálják.

Megkíséreltük a degradációt végző proteázok azonosítását. Nagy mennyiségű vegyes korú lárvák extraktumából bonyolult preparálási procedura végeredményeként sikerült homogenitásig tisztítanunk és tömegspektrometriai módszerrel azonosítanunk azt a szerin-proteázt, amelyik csak a lárvakorban aktív, és szelektíven képes bontani a három poliubiquitin receptort. Jelenleg ennek a fehérjének az *in vitro* és *in vivo* jellemzése (csendesítés RNS-interferenciával, túltermeltetés, génexpressziós vizsgálatok, interakciós kísérletek, stb.) folyik.

A p54-nek csak a C-terminális fele degradálódik a lárvális stádiumokban

Amikor a proteaszómához kötődött p54 alegység degradációjának mechanizmusára szerettünk volna rájönni, egy érdekes és újfajta szelektivitásra lettünk figyelmesek. Az eddigi immunoblot kísérletekben (pl. 13B. és 20A. ábra) a p54 fehérjét három monoklonális ellenanyag (170, 28 és 439) keverékével detektáltuk. Mivel mindegyik antitest különböző epitópot ismer fel (11. és 22. ábra: p54 ***) a p54 C-terminális felében (CTF), nem volt adatunk arra vonatkozóan, hogy mi történik a p54 vWA domént hordozó N-terminális felével (NTF) a degradáció folyamán? Ezért egy *in vitro* degradációs kísérletben embrió-extraktumot inkubáltunk proteolitikusan aktív 60 órás L2-extraktummal 0, 10, 20 és 45 percig (25°C), majd az immunreakciót a p54-NTF-re specifikus poliklonális (α-RSA #1) ellenanyaggal végeztük el. A 21A. ábrán jól látható, hogy a

p54 szelektív degradációjával párhuzamosan megjelent egy diszkrét emésztési termék, amely immunoreaktivitását és molekulatömegét (~28 kDa) tekintve is a p54 vWA domént hordozó N-terminális felének felelt meg, ezért p54 N-terminális degradációs fragmensnek (p54-Ndf) neveztük el. Hogy ennek a jelenségnek a fiziológiai jelentőségét is megértsük, újra megvizsgáltuk a p54 fehérje egyedfejlődési profilját (a 13A. ábrán bemutatott kísérlet alapján), de az immunreakciót a p54-NTF-re specifikus poliklonális ellenanyaggal végeztük el. Az *in vitro* degradációs tesztben azonosított, diszkrét méretű emésztési termék (p54-Ndf) megjelent mindazon lárvális stádiumok preparátumaiban, amelyekből a teljes hosszúságú, endogén p54 alegység hiányzott, de nem lehetett kimutatni az embrió, kései L3, báb és adult mintákban (21B. ábra). Továbbá, míg a 14A. ábrán bemutatott Superose 6 kísérlet embrionális proteaszóma csúcsfrakciójában az α -RSA#1 ellenanyaggal a p54-Ndf degradációs intermediert nem, de a teljes hosszúságú p54-et ki lehetett mutatni, addig a 60 órás lárvális proteaszóma csúcsfrakciókban kizárólag a p54-Ndf jelent meg (nem bemutatott eredmény) a proteaszóma részeként. Ezt korábban nem láthattuk a 14C. ábrán, mert abban a kísérletben a p54 C-terminálisára specifikus ellenanyagokat használtuk!



21. ábra. A p54 N-terminális fele védve marad a p54 fejlődésstádium-specifikus degradációja során.

(A) Embrió-extraktumot (EE) inkubáltunk 60 órás lárvá-extraktummal, majd a p54-NTF-re specifikus (α -RSA #1) ellenanyaggal végeztük el az immunreakciót. A p54 degradációjával párhuzamosan megjelent egy diszkrét emésztési intermedier, a p54-Ndf (Ndf – N-terminális degradációs fragmens), amit ki lehetett mutatni az egyedfejlődés (B) azon lárvális szakaszaiban is, ahol az endogén p54 specifikus eliminálása lejátsszódik.

A fenti megfigyelések azt bizonyították, hogy a lárvastádiumokban aktiválódott proteolitikus enzim a p54 fehérje ubiquitin-interakciós motívumait hordozó C-terminális részét specifikusan leemészt, miközben épen hagyja a vWA domént tartalmazó N-terminális felet (p54-Ndf). Ez utóbbi a 26S proteaszómához kapcsolódva marad.

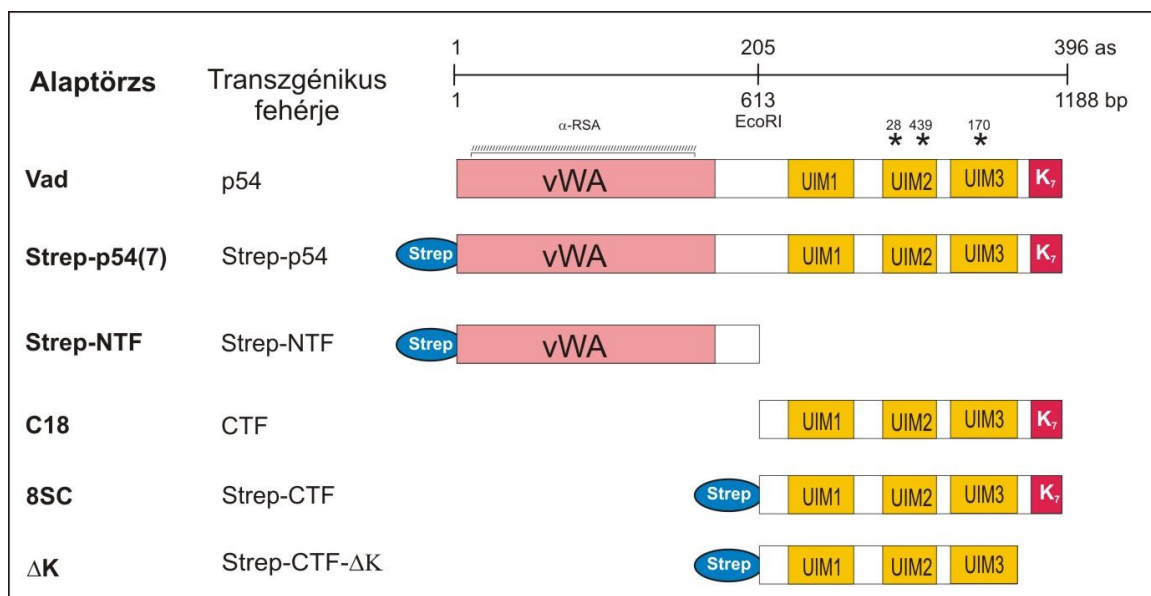
Az online elérhető IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>) predikációs programot használva kiderült, hogy a p54 C-terminális fele (CTF) valószínűleg nem rendelkezik jól definiálható harmadlagos struktúrával (azaz rendezetlen szerkezetű), míg a fehérje N-terminális a vWA doménre jellemző 3D szerkezetet mutatja. Az ilyen rendezetlen szerkezetű fehérjeelemekről köztudott^{69,70}, hogy rendkívül proteáz-érzékenyek, de ha interakciós partnereikkel kapcsolódnak, vagy poszttranszlációs módon módosulnak, az ideiglenesen felvett 3D szerkezet révén immunissá válhatnak a proteolitikus hasításra. A baktériumokban termeltetett p54-CTF rekombináns fehérje rendezetlen szerkezetűségét speciális 2D gélelektroforézis technikával¹⁷¹ kísérletesen is bizonyítottuk (nem bemutatott eredmény). Ezért elképzelhetőnek tartjuk, hogy a muslicák lárváiban az endogén p54 C-terminális fele rendezetlen szerkezetűvé válik (pl. a megszünt poszttranszlációs módosítás következtében), amit aktiválódott, specifikus proteázok leemésztene, így gátolva a 26S proteasóma működését. Érdekes, hogy a Rad23 és Dsk2 is egy-egy igen kiterjedt (297 illetve 430 aminosav hosszú) rendezetlen szerkezetű részt hordoznak. Ezek után nem lenne meglepő, ha kiderülne, hogy a p54, Rad23 és Dsk2 poliubiquitin receptorok eliminációját végző proteolitikus rendszer a három fehérje rendezetlen szerkezetű részét ismeri fel és bontja le. Egy általunk tisztított és azonosított szerin-proteáz pontosan ilyen típusú specificitással rendelkezik (nem bemutatott eredmény).

A p54 fehérje különböző darabjainak túltermeltetése transzgénikus muslicákban

Az *in vitro* vizsgálatok során kimutattuk a poliubiquitin receptorok fejlődésszárny-specifikus szabályozódását, melynek során a p54 a proteasómához kötött (és szabad) állapotban megcsönkul és elveszíti UIM-ait hordozó C-terminális felét. Korábbi kísérleteinkből és irodalmi adatokból tudtuk, hogy a p54 egy struktúrájában és funkciójában is dinamikusan változó molekula. Mivel úgy gondoltuk, hogy a p54 koncentrációjának szabályozása és a feltételezett ingázása között kapcsolat lehet, amely a fehérje modifikációs, és ebből következően a konformációs állapotától függ, olyan *in vitro* és *in vivo* modellrendszereket kerestünk, amiben az ingázás és a módosítás azonosítható és értelmezhető. A legnagyobb problémát a p54 extraproteasómális állapotban történő stabilizálása jelentette.

Még szakdolgozóként kimutattam (diplomamunka), hogy ha nagy moláris feleslegben adagolt rekombináns CBD-p54 fehérjét adunk az exogén Zn^{2+} bevitelére szétesett 26S proteaszómához (amiről a p54 alegység is leválik⁹⁸), akkor a cink elvonását követően, az újból összeszerelődő 26S proteaszómába az endogén p54 helyére képes beépülni a CBD-p54. Az exponált CBD doménnek köszönhetően a teljes holoenzimet egy lépésben kitisztíthatjuk kitin-affinitáskromatográfiával. A beépülés szükséges és elégséges feltétele a vWA domén jelenléte a rekombináns fehérjében, azaz a CBD-p54-NTF még beépül, de a CBD-p54-CTF már nem tud kapcsolódni az endogén p54 helyére. Ezért olyan független transzgénikus állatok létrehozását terveztük, melyek a teljes hosszúságú p54-et, a p54 N-terminális felét (NTF) és p54 C-terminális felét (CTF) képesek nagy mennyiségben túltermelni. Abból a hipotézisből indultunk ki, hogy ha a nagy koncentrációban termeltetett transzgénikus p54 és/vagy az NTF *in vivo* kiszorítja a proteaszómáról az endogén p54-et, akkor a felszabadult p54 extraproteaszómálisan stabilizálódhat, ami lehetőséget adhat funkciójának és módosulásainak tanulmányozására. Minthogy a CBD-p54-CTF poszttranszgenetikus módosításra alkalmas aminosavakat (konzervált lizinek) hordoz, és az N-terminális vWA domén hiányában nem képes beépülni a proteaszómába, úgy gondoltuk, hogy a muslicákban túltermeltetett CTF extraproteaszómálisan stabilizálódhat (modellezve a disszociált endogén p54-et), lehetőséget adva az esetleges módosított formáinak tisztítására és a módosítás típusának azonosítására.

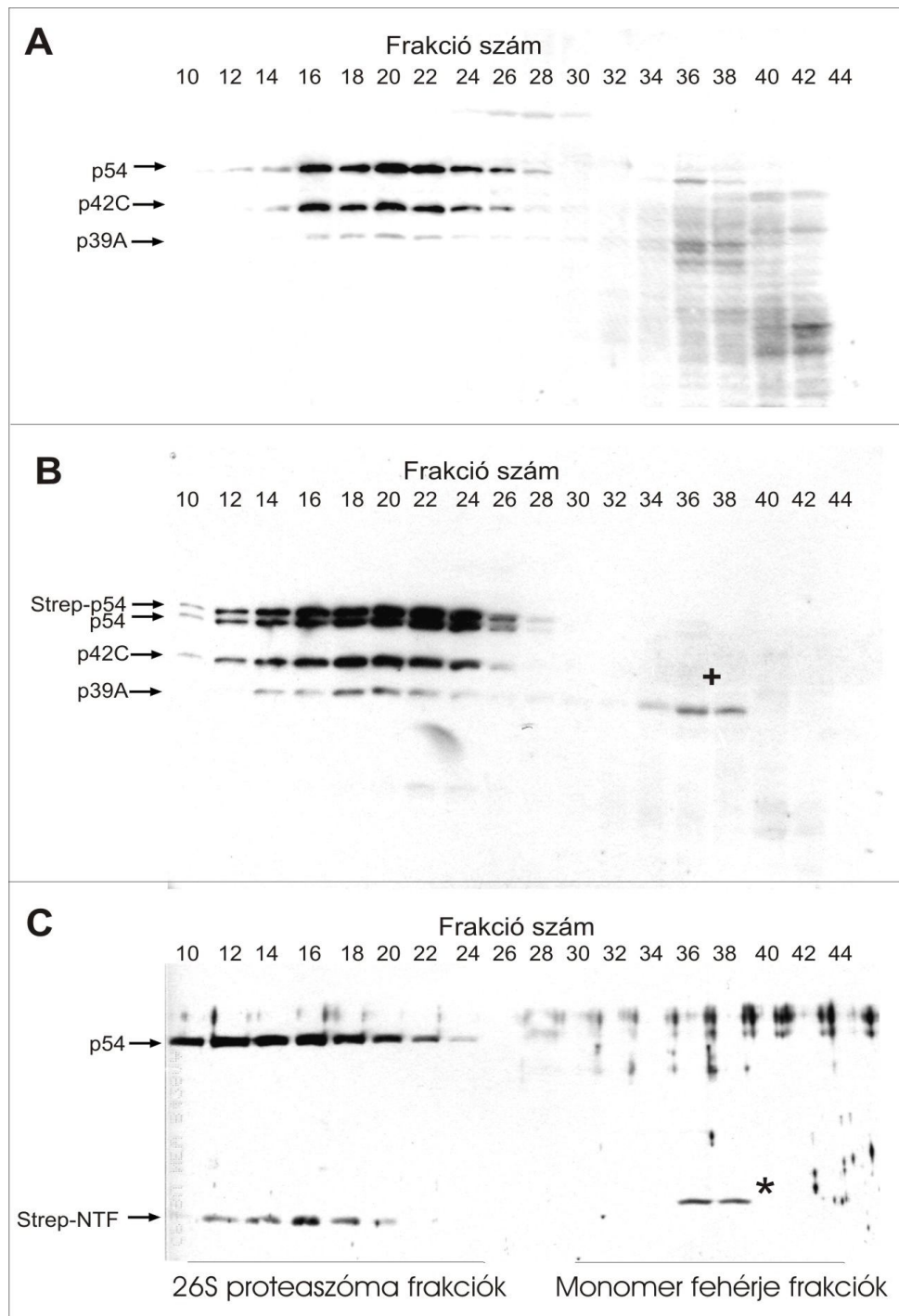
A p54 transzgénikus konstrukciók létrehozásakor a p54 cDNS-ének különböző darabjait (1-1188 bp (p54) teljes hosszúságú; 1-613 bp (NTF) hordozza a vWA domént; 614-1188 bp (CTF) hordozza a három UIM-ot; 614-1143 bp (CTF-ΔK) CTF a terminális lizinek nélkül (22. ábra)) pASK-IBA vektorba a Strep-címkével egy leolvasási keretbe illesztettük. Majd a Strep-p54, Strep-NTF, Strep-CTF, Strep-CTF-ΔK és a csupasz CTF DNS szekvenciákat P-elem alapú pP{UAST} ingázó vektorba klónoztuk, melyet a megfelelő transzformációs rendszer segítségével *Drosophila* embriókba injektáltunk. A létrejött életképes és fertilis transzgénikus alaptörzsek közül (melléklet) azokat tartottunk meg és vizsgáltunk, amelyek semmilyen észlelhető abnormalitással nem rendelkeztek. A független alaptörzseket da-Gal4 általános meghajtóval kereszteztük, így aktiválva a transzgén kifejeződését, és ezáltal a transzgénikus fehérjék túltermelődését (22. ábra). A disszertáció további fejezeteiben, amikor a da-Gal4 meghajtó konstrukció és a meghajtandó transzgén már egy állatban van a da-Gal4/”alaptörzs” nomenklatúrát alkalmazom.



22. ábra. A túltermeltetett p54 transzgénikus fehérjék sematikus képe.

A transzgénikus alaptörzs/túltermelt fehérje elnevezése: Strep-p54(7)/Strep-p54; Strep-NTF/Strep-NTF; C18/CTF; 8SC/Strep-CTF; ΔK/Strep-CTF-ΔK. A konstrukciók főbb jellemzői: **vWA** – von Willebrand-A domén; **UIM 1-2-3** – ubiquitin interakciós motívumok; **K₇** – hét konzervált terminális lizin; **Strep** – Strep-affinitás címke. * - A p54 C-terminális felét (CTF) felismerő monoklonális ellenanyagok (sorrendben: 28, 439 és 170) epitópjai. ///// - A p54 N-terminális felére (NTF) specifikus poliklonális ellenanyag (α-RSA#1) epitópjainak feltételezett helye.

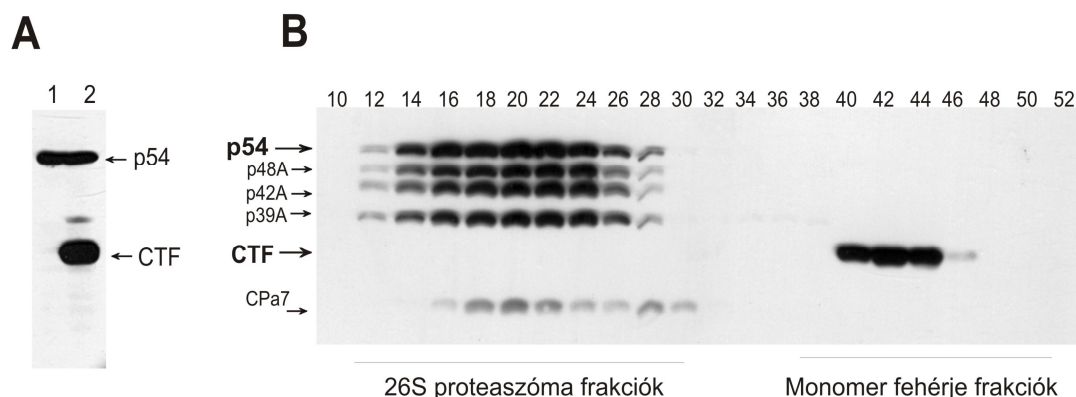
Négy független Strep-p54 törzsből indukáltuk a Strep-p54 termelődését, de egyikben sem tapasztaltunk a vad típustól eltérő fenotipikus elváltozásokat. A da-Gal4/Strep-p54(7) törzsből (imágóból) összfehérje-extraktumot készítettünk, és Superose 6 gél-szűrési kromatográfia segítségével elkülönítettük a 26S proteasómat a monomer fehérjétől. A Strep-p54 (430 as.) és az endogén p54 (396 as.) közti 34 aminosavnyi különbség lehetőséget adott a két fehérje denaturáló gélen történő elkülönítésére. A 23B. ábra tanúsága szerint (összehasonlítva a 23A. ábrával - kontroll) a transzgénikus Strep-p54 fehérje túltermelődött a da-Gal4/Strep-p54(7) állatokban, de az összes Strep-p54 az endogén p54-, p42C- (ATPáz ae.) és p39A (fedél ae.) alegységekkel, azaz a 26S proteasómával együtt eluálódott. Sem az endogén p54, sem pedig transzgénikus Strep-p54 nem jelent meg szabad formában a monomer frakciókban. Hasonló eredményt kaptunk a Strep-NTF-et túltermelő törzseknél (4 különböző da-Gal4/Strep-NTF) is, melyek szintén életképesek, fertilisek és külsőre normálisak voltak. Összfehérje-extraktumuk (imágóból) Superose 6 frakcionálása kimutatta, hogy habár a túltermelődött transzgénikus Strep-NTF maradéktalanul beépült a 26S proteasómába, nem okozta az endogén p54 extraproteasómális felhalmozódását (23C. ábra).



23. ábra. A vWA domént tartalmazó transzgénikus fehérjék beépülnek a 19S regulátor komplexumba.

(A). Meghajtatlan Strep-p54(7) és meghajtott (B) da-Gal4/Strep-p54(7) törzs adultjainak fehérjeextraktumával végzett Superose 6 frakcionálás immunoblot képe p54-, p42C- és p39A regulátor komplex alegységekre specifikus ellenanyagok felhasználásával. A Strep-p54 kvantitatíve beépült a 26S proteasómába. (C) Meghajtott da-Gal4/Strep-NTF törzs adultjainak fehérjeextraktumával végzett Superose 6 frakcionálás immunoblot képe a p54-NTF-re specifikus α -RSA#1 ellenanyag felhasználásával. * - aspecifikus csík. + - a p39A degradációs terméke.

Tehát a da-Gal4/Strep-p54(7) és da-Gal4/Strep-NTF törzsek életképesek és fertilisek voltak, és a bennük termelődött vWA-domént hordozó Strep-p54 és Strep-NTF transzgénikus fehérjék kvantitatíve beépültek (*in vivo*) a 26S proteaszómába, amit nem követett az endogén p54 extraproteaszómális felhalmozódása. Ezzel szemben a p54 C-terminális felét (a továbbiakban csak CTF, 22. ábra) nagy mennyiségben kifejező (24A. ábra) da-Gal4/C18 állatok az egyedfejlődés harmadik lárvastádiumának legvégén elpusztultak. A még élő 120 órás da-Gal4/C18 lárvákból készített fehérjeextraktumot Superose 6 oszlopon megfuttattuk, majd a frakciók tartalmát immunoblottal ellenőriztük. A 24B. ábrán jól látható, hogy a vártan megfelelően a CTF a vWA domén hiányában nem épült be a 26S proteaszómába, és kizárólag a monomer fehérjék frakcióiban jelent meg.



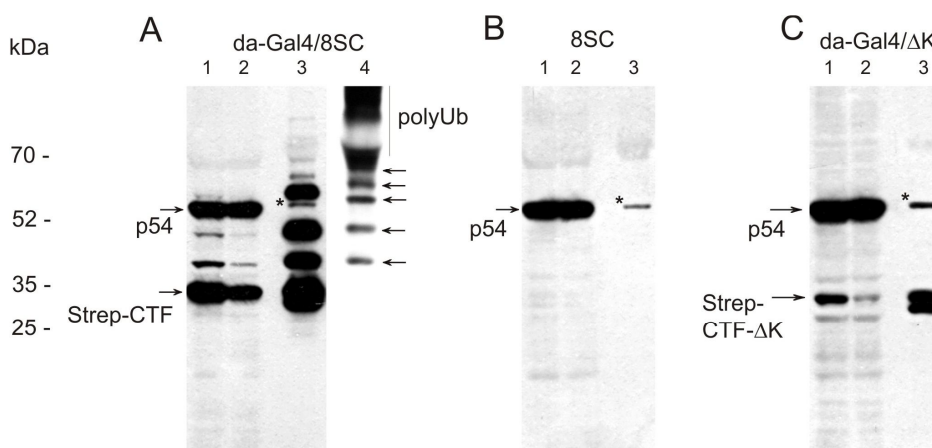
24. ábra. A transzgénikus CTF nem épül be a proteaszómába.

(A) A meghajtatlan C18 alaptörzsben nem (1), míg a meghajtott da-Gal4/C18 (2) törzs harmadik stádiumos élő lárváinak extraktumában nagy mennyiségű CTF transzgénikus fehérjét lehetett kimutatni immunoblottal, a p54 C-terminálisára specifikus (170, 28 és 439) ellenanyagok felhasználásával. (B). A CTF-túltermelő da-Gal4/C18 törzs még élő, 120 órás lárváinak extraktumával végzett Superose 6 frakcionálás immunoblot képe a p54-, p48B-, p42A, p39A- és CP α 7-re specifikus ellenanyagok keverékének felhasználásával. A CTF nem épült be a proteaszómába, hanem a monomer fehérjék frakcióiban extraproteaszómálisan dúsult fel.

A CTF terminális lizinjei ubiquitilálódnak

Korábbi munkánk során⁹⁸ kimutattuk, hogy Zn²⁺ hatására a p54 leválik a proteaszómáról, és kölcsönhatásba lép számos fehérjemodifikációban részt vevő enzimmel. Élesztő-kettős hibrid analízissel igazoltuk, hogy a SUMOilációban szerepet játszó Smt3 SUMO aktiváló-, valamint az Ubc9 SUMO konjugáló enzimek *in vivo* is kölcsönhatásba lépnek a p54 fehérjével. Ez a megfigyelés nagyban támogatta azt az elképzelésünket, miszerint a p54 valamilyen

posztisztetikus módosításon megy keresztül az extraproteasómális állapota előtt vagy folyamán. Mivel a CTF transzgénikus fehérje nem épül be a 26S proteasómába, úgy gondoltuk, hogy alkalmas eszköz lehet a p54 szabad állapotának modellezésére és a feltételezett modifikáció(k) azonosítására. Ezért létrehoztunk egy új transzgénikus törzset (8SC), amely da-Gal4-gyel meghajtva (da-Gal4/8SC) a Strep-CTF transzgénikus fehérje túltermelésére képes. A Strep-CTF a csupasz CTF-hez hasonlóan extraproteasómálisan halmozódik fel (nem bemutatott eredmény), és az állat korai halálát okozza. A da-Gal4/8SC harmadik stádiumos élő lárváiból készített fehérjeextraktumból a Strep-CTF fehérjét Strep-affinitáskromatográfiával kitisztítottuk, majd 10 %-os denaturáló gélen megfuttattuk, és p54-re specifikus monoklonális ellenanyagokkal immunreakciót végeztünk. A 25A. ábrán jól látható, hogy az eluátumban (3. sáv) a Strep-CTF fehérjén kívül, nagyobb molsúlyú p54-immunoreaktív fehérjesávok is feldúsultak, jelezve, hogy a transzgénikus fehérje valamilyen kovalens módosításon ment keresztül. A két legintenzívebb sáv, amely a Strep-CTF-nél csak 8 és 16 kDa-nal nagyobb, már a kiindulási összfehérjeextraktumban is látható volt (25A. ábra, 1. sáv). Kontrollként a Strep-CTF fehérjét nem termelő 8SC alaptörzs lárváinak extraktumával is megismételtük a fenti kísérletet, de az eluátumban (25B. ábra, 3. sáv) nem lehetett kimutatni a p54-immunoreaktív létrázatot.

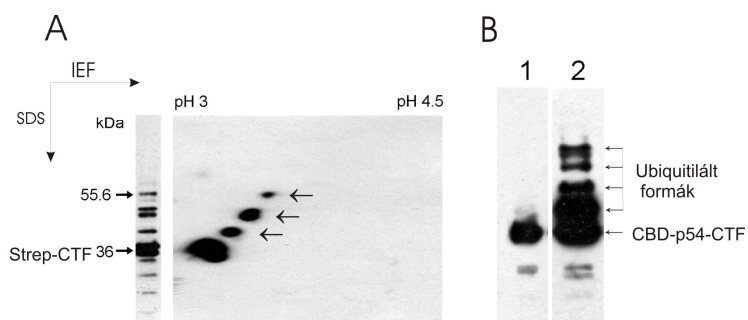


25. ábra. A Strep-CTF terminális lizinjein ubiquitilálódik.

(A) A da-Gal4/8SC állatokból tisztított Strep-CTF-et és kovalensen módosított formáit immunoblottal, p54-re specifikus monoklonális ellenanyagokat használva mutattuk ki az eluált frakcióban (A-3). A nagyobb molsúlyú p54-immunoreaktív sávok ubiquitin-elleni antitesttel is reagáltak (A-4: ←) annak jeléül, hogy a modifikáció típusa ubiquitiláció. Mivel a Strep-CTF három UIM motívumot hordoz, az eluátumban megjelentek a kötődött poliubiquitilált szubsztrátok is (A-4: poliUb). (B) A 8SC (kontroll) alaptörzsből tisztított fehérjék (B-3) között nem lehetett kimutatni a p54-immunoreaktív létrázatot. (C) A terminális lizinek hiányában a Strep-p54-ΔK-n kívül (C-3) nem lehetett kimutatni magasabb molsúlyú p54-immunoreaktív módosított formákat. * - aspecifikusan kötődő endogén p54. 1- kiindulási-, 2 – az oszlopon átfolyt fehérjeextraktum, 3 – eluátum.

A modifikáció helyének meghatározása céljából létrehoztunk egy olyan transzgénikus alaptörzset (ΔK) is, amely a terminális lizinek nélküli Strep-CTF fehérjét képes túltermelni (Strep-CTF- ΔK). A da-Gal4/ ΔK lárvák fehérjeextraktumából sikerült kitisztítani a Strep-CTF- ΔK fehérjét, de az eluátumban (25C. ábra, 3. sáv) nem jelentek meg nagyobb mólsúlyú p54-immunoreaktív sávok. Ez azt bizonyította, hogy a p54 C-terminálisán végbemenő kovalens módosítás a terminális lizinek valamelyikén játszódik le. Mivel a CTF és Strep-CTF túltermelés letális volt, míg a Strep-CTF- ΔK nem, arra következtethetünk, hogy a terminális lizinek permanens módosulása valamilyen módon a CTF és Strep-CTF túltermelő állatok pusztulásához vezet.

A 25A. ábrán megfigyelt 8 kDa-os létrázat, valamint a lizin aminosavak szükségessége alapján azt feltételeztük, hogy a detektált kovalens módosítás ubiquitiláció. Amikor a 25A. ábrán bemutatott eluátumot anti-ubiquitin ellenanyaggal analizáltuk, a p54-immunoreaktív sávokhoz hasonló mintázatot kaptunk (25A. ábra, 4. sáv). A diszkrét ubiquitin-immunoreaktív sávok pedig arra utaltak, hogy a Strep-CTF különböző lizinjeihez több monoubiquitin is kapcsolódott (multi- vagy oligoubiquitilálódott). Az ubiquitiláció tényét közvetlenül tömegspektrometriai analízissel igazoltuk. A da-Gal4/8SC-ből tisztított fehérjét, kihasználva a Strep-CTF savas jellegét, 2D-s IEF-SDS-PAGE segítségével tovább tisztítottuk (26A. ábra), majd a kivágott, Strep-CTF-nél nagyobb p54-immunoreaktív pontokban kimutattuk az ubiquitin triptikus peptidjeinek jelenlétét. A tömegspektrometriai vizsgálat során arra is fény derült, hogy a Strep-CTF-hez nem csak mono, hanem diubiquitin egységek is kapcsolódtak.

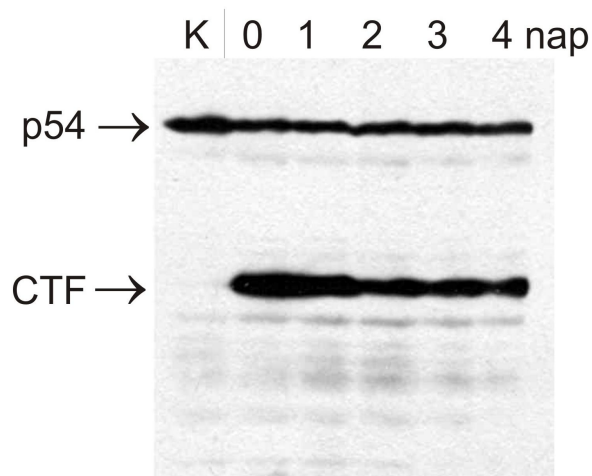


26. ábra. 2D-s IEF-SDS-PAGE és *in vitro* ubiquitiláció.

(A) A Strep-CTF fehérjét és módosított formáit tovább tisztítottuk 2D-s IEF-SDS-PAGE technikával. A Strep-CTF-nél nagyobb p54-immunoreaktív pontokat kivágtuk (\leftarrow), majd tömegspektrometriai módszerrel igazoltuk, hogy a módosítás mono- és/vagy diubiquitiláció. (B) Rekombináns CBD-p54-CTF fehérjét proteaszóma pufferrel, illetve embrió-extraktummal inkubáltunk, majd kitin-affinitáskromatográfiát végeztünk, melynek eluált frakcióit immunoblottal, a p54-re specifikus monoklonális ellenanyagokkal vizsgáltuk meg. A pufferes kezelés hatására nem (B-1), míg embrió-extraktumos kezelés hatására *in vitro* lejátszódott a CBD-p54-CTF ubiquitilációja (B-2).

A CTF ubiquitilációját *in vitro* is sikerült reprodukálni. A CBD-p54-CTF rekombináns fehérjét kitin gyöngyhöz kötöttük, majd proteaszóma alappuffert (kontroll), illetve *Drosophila* embrió-extraktumot (ATP és ubiquitin jelenlétében) keringtettünk az oszlopon. Az aspecifikusan kötődött fehérjék eltávolítását követően a rekombináns CBD-p54-CTF fehérjét SDS-sel eluáltuk. Az eluált frakciókban az embrió-extraktummal előkezelt minta esetében (26B. ábra, 2. sáv) megjelent a p54-immunoreaktív 8 kDa-os létrázat, míg a kontroll esetében csak a rekombináns fehérje volt detektálható (26B ábra, 1. sáv).

Bernard Crosas és munkatársai kimutatták, hogy az élesztő p54 ortológja (Rpn10) poliubiquitilálódik, ami a szabad Rpn10 molekulák kvantitatív és gyors degradációjához vezet¹¹⁴. Minthogy csak közvetett bizonyítékunk volt a Strep-CTF ubiquitilációjának típusára, amelynek fiziológiai hatását nem ismertük, szükségszerűnek tartottuk megbecsülni a CTF *in vivo* féléletidejét is. Mivel a da-Gal4/C18 állatok a lárvakorban elpusztulnak, egy olyan új törzset hoztunk létre, melyben a CTF kifejeződése az állat bármely fejlődési stádiumában specifikusan, hősokkolással indukálható. A Gal80^{ts20}/da-Gal4/C18-nak elnevezett transzgénikus állatok petéit 19°C-on (ekkor gátolt a CTF kifejeződése) adult korig növesztettük, majd hősokkolással (30°C, 36 óra) indukáltuk bennük a CTF termelődését. Ezután az állatokat visszahelyeztük 19°C-ra (ezen a hőmérsékleten már nem termelődik újabb CTF), és különböző időpontokban megvizsgáltuk egy-egy muslica CTF tartalmát. Azt találtuk, hogy a CTF féléletideje 19°C-on minimum 2 nap (27. ábra), ezért kijelenthetjük, hogy a CTF ubiquitilációja nem okozza a fehérje gyors lebomlását, azaz nem degradációs jel.



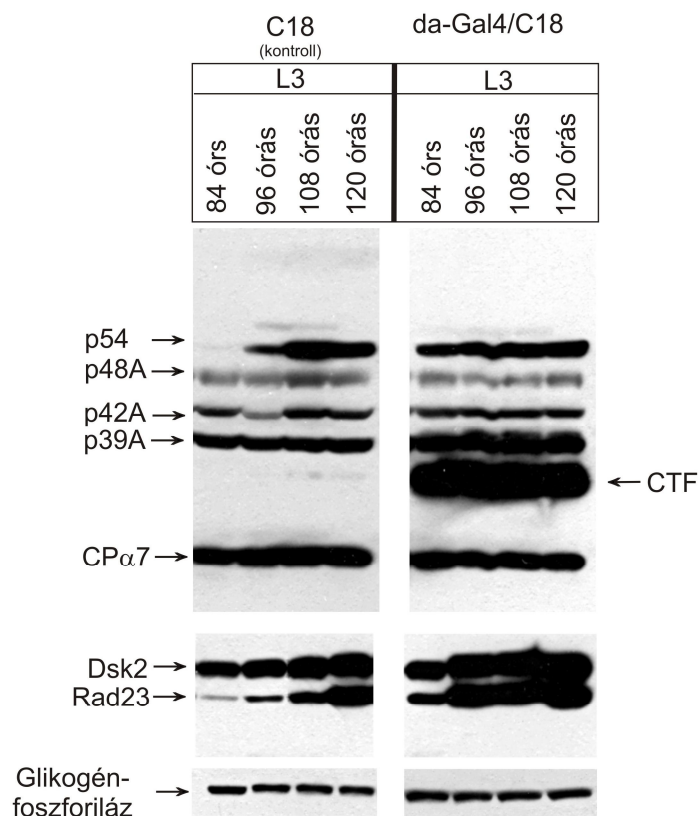
27. ábra. A CTF féléletideje minimum 2 nap.

Hősokkolással indukáltuk a CTF termelődését Gal80^{ts20}/da-Gal4/C18 transzgénikus adult állatokban, majd 36 óra elteltével restriktív hőmérsékletre helyeztük őket, meggátolva újabb CTF keletkezését. Ez követően a 0., 1., 2., 3., és 4. napon egy-egy muslicában immunoblottal megvizsgáltuk a CTF mennyiségét p54-re specifikus ellenanyaggal. A CTF féléletidejét a fenti ábra alapján minimum 2 napra becsültük. **K** – nem hősokkolt Gal80^{ts20}/da-Gal4/C18 (nincs CTF termelődés)

A fenti kísérletek egyértelműen bizonyították, hogy a p54 C-terminálisán elhelyezkedő konzervált lizinek nem poliubiquitilálódnak. A poliubiquitiláció, mint degradációs jel ellen szól, hogy a szabad CTF féléletideje relatíve hosszú (2 nap), ami összehasonlíthatatlan az élesztő poliubiquitilált Rpn10 45 perces túlélésével¹¹⁴. Ha a CTF poliubiquitilálna (K48), néhány óra elteltével már biztosan nem tudnánk kimutatni szabad transzgénikus fehérjét. Habár többfajta (2. ábra) poliubiquitin jel is létezik (nem csak degradációs), a p54 poliubiquitilációja ellen szól az is, hogy a tisztított ubiquitilált formák diszkrét sávokként, nem pedig elkenődéseként (az elágazó láncok miatt) jelentek meg a RTG-filmen (25A. ábra, 3-4. sáv). Ma úgy gondoljuk, hogy a p54 ubiquitilációja a fehérje extraproteasómális funkciójához és a rendezetlen szerkezetű C-terminális rész védelméhez szükséges. Tudjuk, hogy a terminális lizinek hiányában (Strep-CTF- Δ K) nem történik meg az ubiquitilálódás, és ebben az esetben a transzgénikus állatok (da-Gal4/ Δ K) életben maradnak. Ez azt sugallja, hogy a da-Gal4/C18 és da-Gal4/8SC lárvákban az extraproteasómálisan stabilizálódott és felhalmozódott ubiquitilált CTF és Strep-CTF valamilyen esszenciális folyamatot gátolva vagy módosítva okozzák az állatok korai pusztulását. A továbbiakban ennek jártunk utána.

A CTF termelődése megzavarja a poliubiquitin receptorok fejlődéstádium-specifikus szabályozását

Mivel a CTF-túltermelő transzgénikus állatok a lárvában pusztulnak el, a C18 alap- (kontroll) és a da-Gal4/C18 törzs szinkronizált fejlődésű, különböző korú (84, 96, 108 és 120 órá) lárvacsoportjaiban immunoblottal megvizsgáltuk a 26S proteasóma alegységösszetételét. Hasonlóan a vad típushoz (13B. ábra) a C18 lárvákban a p54 koncentrációja a többi 19S regulátor komplex alegységhez viszonyítva alacsony volt (28. ábra), s csak a 108 órá kései L3 állapotban kezdett emelkedni. A vad típusban észleltekkkel megegyező eredményt kaptunk a Rad23 és Dsk2 poliubiquitin receptorok esetében is (28. ábra). Ezzel szemben a CTF-túltermelő da-Gal4/C18 lárvákban az endogén p54 akkumulálódása egy nappal korábban, már a 84 órá L3 stádiumban bekövetkezett. Ezzel párhuzamosan a Rad23 és Dsk2 felhalmozódása is a késeiről a nagyon korai harmadik lárvastádiumra tolódott vissza (28. ábra.).

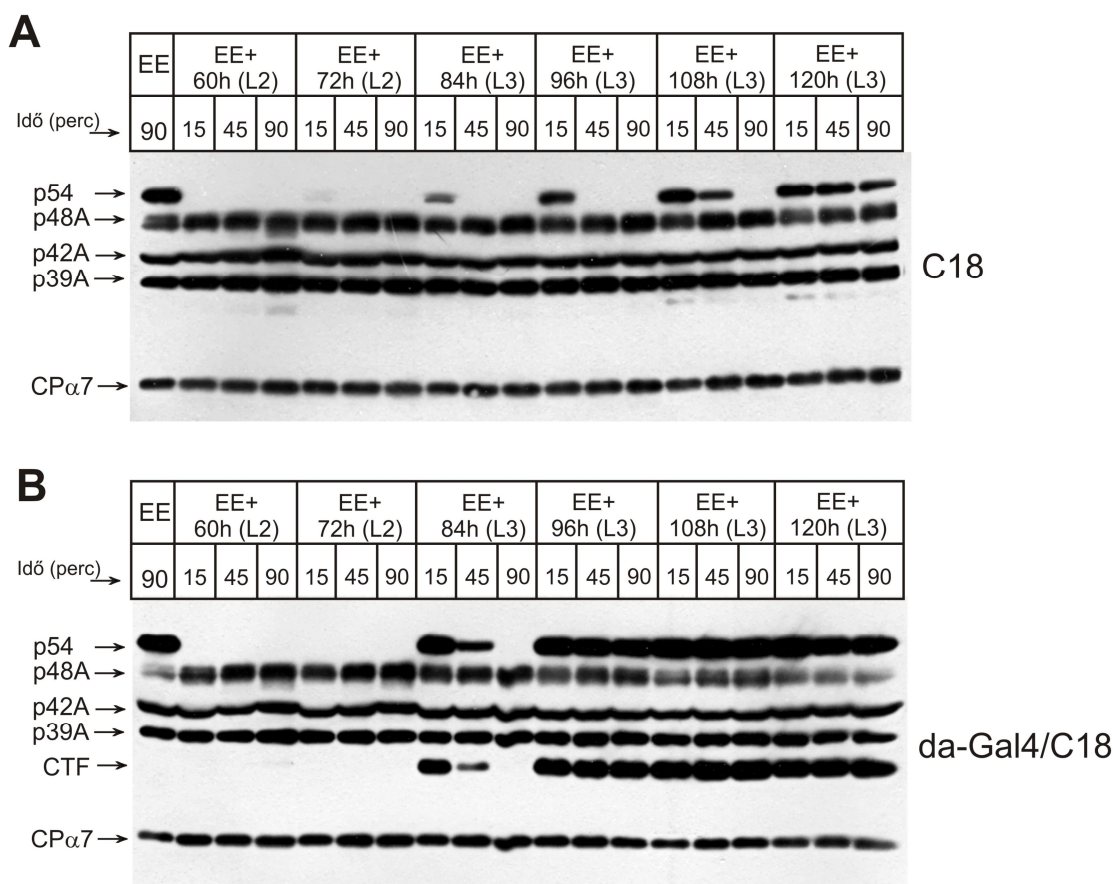


28. ábra. A CTF fehérje túlermelődése megzavarja a poliubiquitin receptorok fejlődésszádium-specifikus szabályozásának folyamatát.

Összfehérje-extraktumokat preparáltunk szinkronizált 84, 96, 108 és 120 órás C18 (kontroll) és CTF-túlermelő da-Gal4/C18 lárvákól, 9 %-os denaturáló poliakrilamid gélen megfuttattuk, majd p54-, p48A-, p42A-, p39A- és CP α 7-, Dsk2- és Rad23-, valamint glikogén-foszfórilázra (bemerési kontroll) specifikus ellenanyagokkal immunoblotot végeztünk. A CTF hatására a p54, Rad23 és Dsk2 normál (sztöchiometrikus) szintre térése korábbi stádiumra tolódott a da-Gal4/C18 törzsben, mint a kontroll C18 alaptörzsben – a CTF gátolta a poliubiquitin receptorok megfelelő szinten tartását.

A 20. ábrán bemutatott kísérlet azt bizonyította, hogy a poliubiquitin receptorok az egyedfejlődés lárvastádiumának kezdeti szakaszában a lárvákban aktiválódott specifikus proteáz hatására degradálódnak. Ezért azt feltételeztük, hogy a da-Gal4/C18 törzsben a túlermelődött és ubiquitilált CTF hatására korábbi stádiumokban gátlódott a szerin-proteáz, ami a poliubiquitin receptorok lebontásának zavarához vezethetett. Ennek bizonyítására szinkronizált 60, 72, 84, 96, 108 és 120 órás C18 (kontroll) és da-Gal4/C18 lárvákól készített fehérjepreparátumokhoz azonos mennyiségű embrió-extraktumot adtunk, majd 25°C-on 15, 45 és 90 percig *in vitro* inkubáltuk. Ezután a reakciókat forralással leállítottuk, a mintákat denaturáló gélen megfuttattuk, majd a proteaszóma alegységösszetételének változását immunoblottal megvizsgáltuk. A 29A. ábra tanúsága szerint a C18 lárvák p54 degradációs mintázata tökéletesen azonos a vad típusban megfigyelt profillal (20A. ábra). Az embrió 26S proteaszómához kötött p54 már rövid inkubációt

követően is teljes mértékben lebomlott a 60, 72, 84 és 96 órás lárvák fehérjeextraktumában, és csak a 108 órás mintához adva maradt meg.



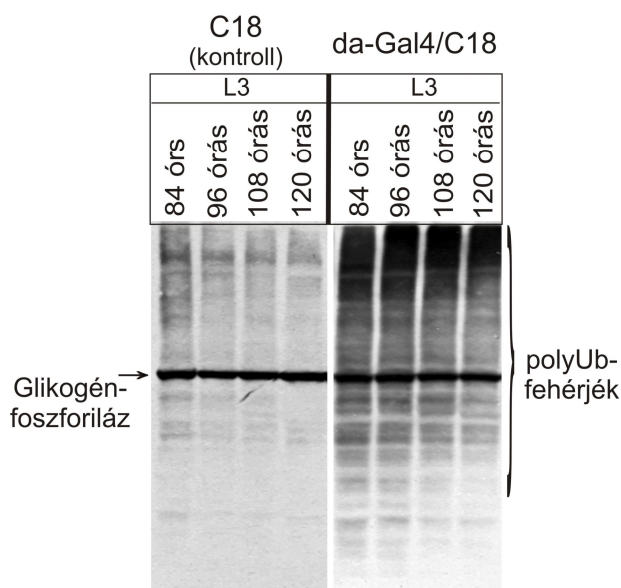
29. ábra. A CTF gátolja a lárvá-extraktumok p54-specifikus proteolitikus aktivitását.

(A) C18 (kontroll) és (B) CTF-túltermelő da-Gal4/C18 törzsek 60, 72, 84, 96, 108 és 120 órás lárváiból készített fehérjepreparátumhoz embrió-extraktumot adtunk, majd a reakcióelegyet 15, 45 és 90 percig 25°C-on inkubáltuk. A p54 degradálódását immunoblotol analizáltuk a 20A. ábrán leírtaknak megfelelően. A C18-hoz képest (108-120 órás) a da-Gal4/C18-ban a CTF hatására korábban, már a 84 órás lárvá-extraktumban gátlódott a poliubiquitin receptorok lebontását végző proteolitikus rendszer. EE-90: embrió-extraktum önmagában inkubálva.

A CTF-túltermelő da-Gal4/C18 állatok 60 és 72 órás korai lárváinak (L2) preparátumában az extrém magas proteolitikus aktivitás következtében nem csak az extraktumhoz adott embrionális p54, hanem az ektopikusan túltermeltetett (lárvá-extraktumból származó) CTF transzgénikus fehérje is specifikusan lebomlott! Majd a 84 órás L3 állapotra a degradációs aktivitás hirtelen lecsökkent (ami a CTF és az endogén p54 szintjének stabilizálódásához vezetett), mígnem a 96 órás lárvákban már teljesen megszűnt – szemben a kontrollban megfigyelt 120 órával. Hasonló eredményt kaptunk a Rad23 és Dsk2 vizsgálatokor is (nem bemutatott

eredmény). Összehasonlítva a 29A. és 29B. ábrákat kijelenthetjük, hogy a da-Gal4/C18 törzsben a túltermelő CTF fejlődésstádium-specifikusan gátolta az endogén p54, Rad23 és Dsk2 szelektív lebontását végző lárvális szerin-proteázt. A fenti *in vitro* degradációs kísérletek eredményei tökéletesen magyarázzák a CTF-túltermelő da-Gal4/C18 lárvák poliubiquitin receptorainak fejlődési mintázatában bekövetkező *in vivo* változásokat (28. ábra). Az összes eddig megismert adat szerint az extraproteasómálisan stabilizálódott és felhalmozódott CTF és/vagy annak ubiquitilált formái befolyásolják a poliubiquitin receptorok fejlődésstádium-specifikus szabályozását azáltal, hogy gátolják a receptorok lebontását végző lárvális proteáz működését. Vélhetőleg ez a zavar is elősegíti a da-Gal4/C18 állatok korai halálát.

Irodalmi adatok alapján tudtuk, hogy az S5a és Rpn10 (a p54 humán és élesztő ortológjai) túltermeltetése két különböző poliubiquitilált modellszubsztrát proteasóma általi lebontását gátolja meg^{140,173}. Ennek fényében elképzelhetőnek tartottuk, hogy a da-Gal4/C18 lárvákban a CTF extraproteasómális felhalmozódása a poliubiquitilált fehérjék lebontásának normális ütemét is megzavarja, ami az állatok kései L3 letalitásához vezet. A 30. ábrán jól látható, hogy a C18 kontrollhoz képest a da-Gal4/C18 lárvákban, ahol a CTF koncentrációja már elegendően magas (28. ábra), felhalmozódtak a poliubiquitilált fehérjék.

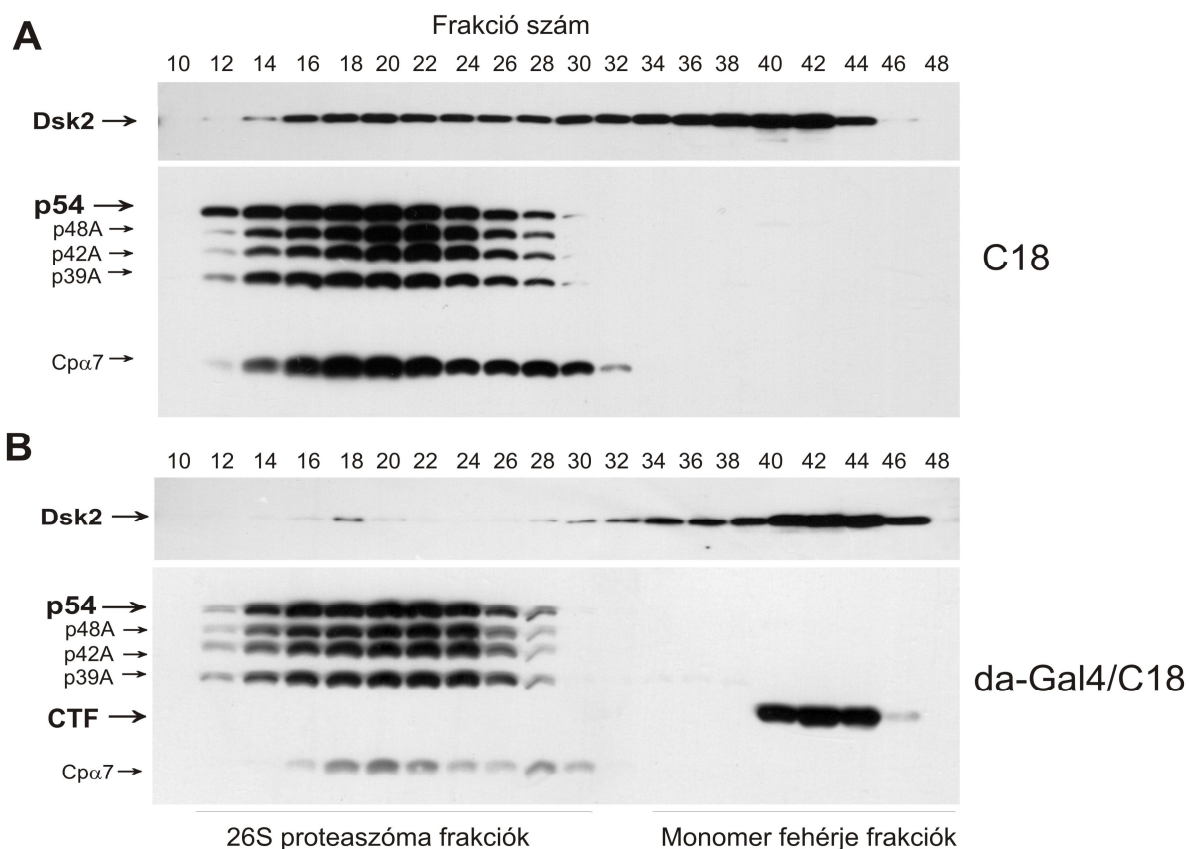


30. ábra. A CTF-túltermelő da-Gal4/C18 lárvákban felhalmozódnak a poliubiquitilált fehérjék.

A szinkronizált 84, 96, 108 és 120 órás C18 (kontroll) és CTF-túltermelő da-Gal4/C18 lárvákból nyert fehérjeextraktumokat 7 %-os denaturáló poliakrilamid gélen megfuttattuk, majd ubiquitinre és glikógen-foszfórilázra (bemérési kontroll) specifikus ellenanyagokkal immunoblotot végeztünk. A C18 (kontroll) lárvákhoz képest a CTF-túltermelő da-Gal4/C18 lárvákban akkumulálódtak a poliubiquitilált fehérjék.

A Dsk2-p54 kölcsönhatás esszenciális az ubiquitin-proteaszóma rendszer működéséhez

A poliubiquitilált fehérjék, valamint az endogén p54, Rad23 és Dsk2 poliubiquitin receptorok szimultán akkumulálódása a CTF-túltermelő da-Gal4/C18 lárvákban első ránézésre nem logikus. Miért halmozódnak fel a lebontandó szubsztrátok, ha a proteaszómához szállító receptorok mennyisége kielégítően magas? Ezt a látszólagos paradoxont a következő kísérlettel oldottuk fel. C18 (kontroll) és da-Gal4/C18 120 órás, kései vándorló lárváiból készített fehérjeextraktumokat Superose 6 gél-sűrő oszlopon megfuttattuk, majd az eluált frakciókat immunoblottal vizsgáltuk külön Rad23-, Dsk2-, valamint proteaszóma alegységekre specifikus ellenanyagokkal. A C18 (kontroll) kései 120 órás lárvákban a szabad és a proteaszómához kötött Dsk2 megoszlási aránya kb. 60/40 % volt (31A. ábra), igazolva, hogy a Dsk2 poliubiquitin receptor a 26S proteaszómához nagy affinitással képes kapcsolódni. Meglepetésünkre a da-Gal4/C18 kései 120 órás lárvákban a Dsk2 zöme a monomer fehérjefrakciókban jelent meg ott, ahol a túltermelt CTF transzgénikus fehérje is eluálódott, míg a proteaszóma csúcsfrakciókban csak nyomokban lehetett kimutatni (31B. ábra). Ez a megfigyelés azt sugallta, hogy az extraproteaszómálisan stabilizálódott CTF és/vagy annak ubiquitilált formái nem csak a poliubiquitin receptorok szabályozását végző proteolitikus rendszert gátolják, és nem csak az endogén p54 életciklusát és funkcióját zavarják meg, hanem megkötik az összes szabad Dsk2-t is. Így a fő UBA/UBL poliubiquitin receptor nem tud a proteaszómához szubsztrátokat szállítani, aminek következménye a poliubiquitilált fehérjék felhalmozódása, és ami nyilvánvalóan a da-Gal4/C18 állatok korai letalitásának a fő oka. A Rad23 mindkét törzsben kizárólag extraproteaszómálisan helyezkedett el - valószínűleg a lárvastádiumban nem kapcsolódik a proteaszómához (nem bemutatott eredmény).

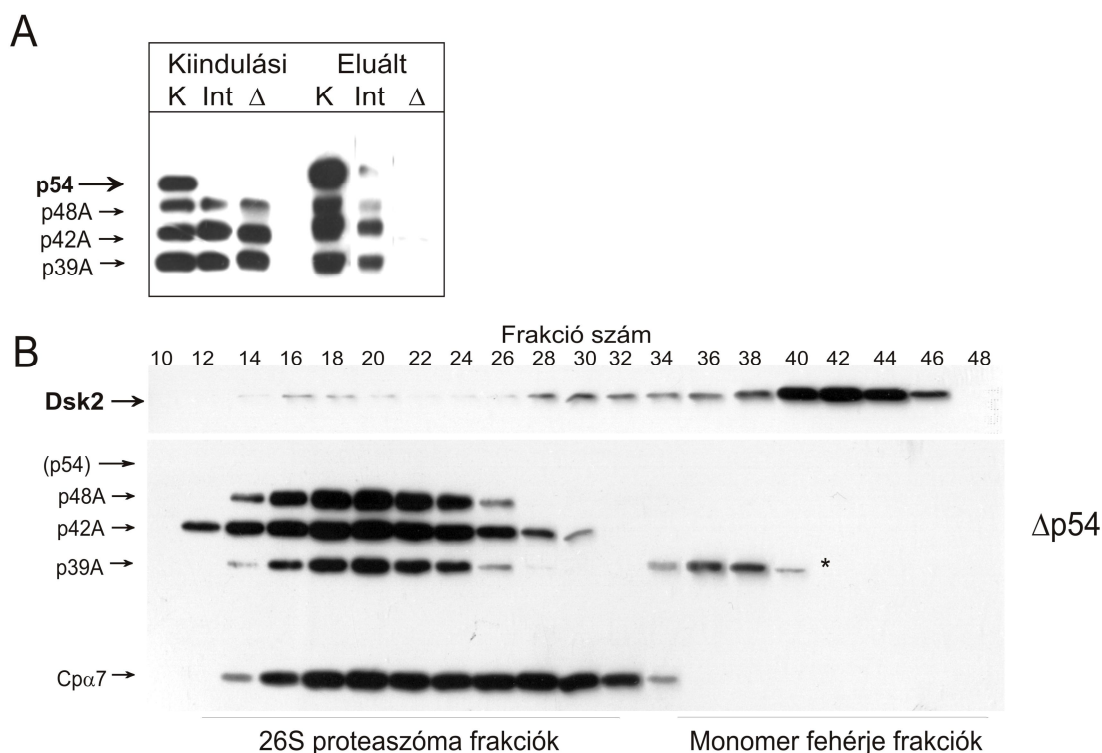


31. ábra. A Dsk2 nem képes a proteasómához kapcsolódni a CTF-túltermelő da-Gal4/C18 állatokban.

A C18 (kontroll) alaptörzs és a CTF-túltermelő da-Gal4/C18 törzs 120 órás kései lárváiból készített extraktumot Superose 6 gélzsűrő oszlopon megfuttattuk, majd Dsk2-, illetve p54-, p48A-, p42A-, p39A- és CPα7-specifikus ellenanyagokkal immunoblotot végeztünk. (A) A C18 esetében az endogén Dsk2 jelentős része a proteasómával együtt eluálódott. (B) Ezzel szemben a da-Gal4/C18-ban a Dsk2 szinte kizárólag extraproteasómáisan eluálódott, a CTF-el együtt. Tehát a CTF megakadályozza a Dsk2 proteasómához való kötődését.

A fenti *in vivo* megfigyelésből kiindulva, miszerint a CTF kölcsönhatásba tud lépni a Dsk2-vel, arra következtettünk, hogy normálisan a *Drosophila* Dsk2 az endogén p54 C-terminális feléhez (és/vagy azon keresztül a proteasómához) kapcsolódik. Habár a Dsk2 UBL doménje és a p54 UIM3 motívuma közti közvetlen kapcsolatot *in vitro* „pull-down” kísérletekben használt rekombináns fehérjék segítségével korábban már igazoltuk (nem bemutatott eredmény), szeretnénk volna specifikusabban is bizonyítani a két receptor kölcsönhatását. Ezért a GST-Dsk2-UBL (15. ábra) rekombináns fehérjével (ami önmagában nem köt poliubiquitilált szubsztrátokat) töltött glutation-Sepharose oszlopon vad típusú, da-Gal4/p54^{RNSi} (a *Pros54* aktivitását erősen csendesítő „p54-knock-down” mutáns) és $\Delta p54$ (*Pros54* deléció, p54-mentes „knock-out”

mutáns¹³³) bábok extraktumát cirkuláltattuk külön-külön. Az eluátumban a szokásos immunoblot módszert alkalmazva megvizsgáltuk a 26S proteasóma jelenlétét.



32. ábra. A Dsk2 a p54-en keresztül kötődik a 26S proteasómához.

(A) GST-Dsk2-UBL fehérjével töltött oszlopra vad (K), da-Gal4/p54^{RNSi} (Int) és Δp54 (Δ) bábok extraktumát töltöttük, majd az eluátumban p54-, p48A-, p42A- és p39A-specifikus monoklonális ellenanyagokkal vizsgáltuk a proteasóma jelenlétét. A p54 hiányában nem kötődött a proteasóma a Dsk2 UBL-doménjéhez. (B) Δp54 báb-extraktumot Superose 6 oszlopon frakcionáltunk, majd Dsk2-, p54-, p48A-, p42A-, p39A- és CPα7-specifikus ellenanyagokkal immunoblotot végeztünk. A p54-mentes 26S proteasómához nem kötődik az endogén Dsk2. (p54) – nincs p54 a proteasómában. * - a p39A degradációs terméke

Vad típusú bábok extraktumából a GST-Dsk2-UBL hatékonyan kötötte az intakt 26S proteasómát (32A. ábra). Habár a da-Gal4/p54^{RNSi} bábok nyers fehérjeextraktumában nem lehet kimutatni a p54 fehérjét, az eluátumban megjelent 26S proteasóma tartalmazott p54-et (32A. ábra). Vagyis a GST-Dsk2-UBL csak és kizárólag azokat a proteasómákat halászta ki, amelyek a *Pros54* transzkriptum koncentrációjának (RNS-interferencia) nagymértékű csökkenése ellenére is szintetizálódott és megmaradt kis mennyiségű p54 fehérjét legalább az egyik regulátor komplexumukba beépítették. Ezzel szemben a GST-Dsk2-UBL a p54-mentes Δp54 bábok (ahol

nincs *Pros54* expresszió) extraktumából egyáltalán nem kötött proteaszómát (32A. ábra). A fenti *in vitro* kísérletek egyértelműen azt bizonyították, hogy a poliubiquitilált fehérjéket szállító *Drosophila* Dsk2, UBL doménjével a p54-en keresztül kapcsolódik a 26S proteaszómához.

Ezt követően $\Delta p54$ bábok extraktumával végzett Superose 6 gélszűrési kromatográfia segítségével kimutattuk, hogy a Dsk2-nek *in vivo* is szüksége van a p54-re a holoenzimre történő dokkolás során. Ugyanis a p54-mentes proteaszómához nem kapcsolódott endogén Dsk2 (32B. ábra), helyette az extraproteaszómális frakciókban halmozódott fel, hasonlóan, mint a da-Gal4/C18 lárvákban (31B. ábra). A fenti megfigyelések alapján kijelenthetjük, hogy *Drosophilában* a Dsk2 a p54-en keresztül kötődik a 26S proteaszómához.

Az *in vitro* vizsgálatokat genetikai kísérletekkel kívántuk kiegészíteni a p54 és Dsk2 (esetleg Rad23) *in vivo* kapcsolatának igazolására. A továbbiakban előzetes eredményeinket szeretném bemutatni. Az *in vivo* kísérletekhez újabb transzgénikus törzseket állítottunk elő, melyek az UAS/Gal4 rendszer szabályainak megfelelően vagy túltermelni, vagy az RNS-interferencia jelenségét kihasználva csökkenteni képesek az endogén/transzgénikus p54, Rad23 és Dsk2 fehérjék mennyiségét. Az endogén Dsk2 koncentrációja szignifikánsan lecsökkent a da-Gal4/Dsk2^{RNSi}, Dsk2-specifikus dsRNS-t túltermelő transzgénikus állatokban. Ezzel szemben a da-Gal4/Dsk2^{Flag} P-elem inszerciós Flag-Dsk2 túltermelő mutánsokban a transzgénikus Dsk2 moláris mennyisége jelentősen megnőtt az endogén Dsk2-höz képest (nem bemutatott eredmény). Meglepő módon mindkét törzsben (csendesítő és túltermelő) felhalmozódtak a poliubiquitilált fehérjék, és az állatok a legutolsó bábstádiumban (farát adult) elpusztultak. Ez a megfigyelés azt sugallta, hogy az endogén Dsk2 koncentrációjának bármilyen irányú megváltoztatása a Dsk2-specifikus szubsztrátok lebontásának dinamikus egyensúlyát megzavarva az állatok pusztulását okozza.

Korábbi vizsgálatokból kiderült, hogy a p54 teljes hiánya ($\Delta p54$) korai, polifázisos letalitást okoz¹³³, amit a poliubiquitilált fehérjék és a proteaszóma alegységek felhalmozódása előz meg. Ennek ismeretében nem meglepő, hogy a *Pros54* dsRNS-t túltermelő da-Gal4/p54^{RNSi} transzgénikus állatokban a *Pros54* mRNS-ének *in vivo* eltávolítása a p54 fehérje mennyiségének csökkenését, és ennek következtében az állatok kései bábstádiumban (farát adult) bekövetkező pusztulását okozta. A csökkent p54 koncentráció a p54 null-mutánsához ($\Delta p54$) hasonlóan¹³³ a többi proteaszóma alegység feldúsulását, valamint a poliubiquitilált fehérjék felhalmozódását (a Dsk2 túltermelő törzshöz hasonlóan) idézte elő. Ezzel szemben a p54-túltermelő da-Gal4/Strep-

p54(7) transzgénikus állatok életképesek maradtak, és a poliubiquitilált szubsztrátok mennyisége sem változott a vad típushoz képest (nem bemutatott eredmény). Habár nincs bizonyítékunk az elméletünkre, mégis úgy gondoljuk, hogy a túltermeltetett transzgénikus p54 megjelenésével a proteasóma gének aktivitása a koordinált szabályozásuknak köszönhetően megnőtt. Az ily módon keletkezett nagy mennyiségű proteasóma pedig képes volt befogadni a feleslegben lévő p54 fehérjéket visszaállítva a sejt működéséhez szükséges megfelelő egyensúlyt.

Az első érdekes eredményt akkor kaptuk, amikor egyazon transzgénikus állatban indukáltuk a p54 és Dsk2 mennyiségének csökkentését (da-Gal4/p54^{RNSi}/Dsk2^{RNSi}), ugyanis az állatok korábbi bábstádiumban pusztultak el, mint bármelyik egyszeres csendesítő mutáns. Habár a Dsk2 túltermeltetése önmagában letális volt, ha ugyanazon transzgénikus állatban, szimultán végeztük a transzgénikus p54 és Dsk2 expresszáltatását, akkor meglepő módon az állatok életben maradtak és tovább szaporodtak, sőt a poliubiquitilált fehérjék lebontása sem szenvedett kárt (nem bemutatott eredmény). Ez a két kísérleti megfigyelés egyértelmű genetikai interakciót sugallt a p54 és Dsk2 között.

Ma a következőképpen magyarázzuk a fenti eredményeket. A Dsk2 specifikus poliubiquitilált fehérjéket ismer fel és szállít a 26S proteasómához. Ha a Dsk2 mennyiségét lecsökkentjük (da-Gal4/Dsk2^{RNSi}), akkor a lebontandó szubsztrátjai stabilizálódnak, és az állat elpusztul. Ugyanezt a jelenséget figyelhetjük meg, ha a Dsk2-t a CTF-fel csapdába ejtjük (31B. ábra) vagy kizárjuk a 26S proteasómából (32B. ábra). Ugyanakkor a nagy moláris feleslegben túltermeltetett Dsk2 (da-Gal4/Dsk2^{Flag}) összegyűjti a poliubiquitilált fehérjéket, de mivel az endogén p54 (amelyen keresztül kapcsolódik a proteasómához) nem képes ilyen mennyiségű Dsk2-szubsztrát komplex megkötésére, szintén a Dsk2 szubsztrátok extraproteasómális felhalmozódását és az állat pusztulását idézi elő. Ebből arra következtethetünk, hogy a Dsk2 szubsztrátok lebomlása esszenciális a sejt megfelelő működésének fenntartásához, és ennek bármilyen zavara az állatok halálához vezet. Ezen a vonalon maradva magyarázhatjuk a *Pros54*-csendesítő da-Gal4/p54^{RNSi} állatok letalitásának okát is. Ugyanis, ha azt feltételezzük, hogy a Dsk2 az endogén p54-en keresztül kapcsolódik a regulátor komplexumhoz, akkor a p54 hiányában nem csak a p54-, hanem a Dsk2-specifikus poliubiquitilált fehérjék lebontása is gátlődik. A helyzetet természetesen súlyosbítja, ha egy állaton belül mindkét poliubiquitin receptor mennyiségét egyszerre nagyon alacsony szintre csökkentjük (da-Gal4/p54^{RNSi}/Dsk2^{RNSi}). Ezzel szemben, ha a p54 és Dsk2 koncentrációját transzgénikus fehérjék termeltetésével

szimultán megemeljük, akkor a proteaszóma gének koordinált működésének köszönhetően elegendő proteaszóma fog összeszerelődni, amibe a moláris feleslegben lévő transzgénikus p54 az endogén p54-gyel együtt beszállítja a szubsztráttal töltött transzgénikus/endogén Dsk2 fehérjét. Így sem a p54-, sem pedig a Dsk2 szubsztrátok lebontási folyamata nem sérül.

Habár a *Rad23* csendesítése (da-Gal4/*Rad23^{RNSi}*) és a transzgénikus *Rad23* túltermeltetése (da-Gal4/*Rad23^{Flag}*) nem okozta sem a poliubiquitilált fehérjék látványos felhalmozódását, sem pedig az állatok pusztulását, a *Rad23* és a p54 egyidejű csendesítése (da-Gal4/p54^{RNSi}/*Rad23^{RNSi}*) a da-Gal4/p54^{RNSi} transzgénikus állatokban megfigyelt farát adult letalitást egy korábbi bábstádiumra tolta vissza – jelezve a *Rad23* és a p54 gyenge genetikai kölcsönhatását. A *Rad23* és p54 szimultán túltermelése (da-Gal4/Strep-p54(7)/*Rad23^{Flag}*) a vártan megfelelően nem okozott semmilyen elváltozást.

A poliubiquitin receptorok *in vivo* kölcsönhatásait vizsgáló kísérletek eredményeit a 3. táblázat foglalja össze.

Törzs neve	Túltermel ↑	Fenotípus
	Csendesít ↓	
da-Gal4/p54 ^{RNSi}	p54 ↓	Letális (farát adult)
da-Gal4/Strep-p54(7)	p54 ↑	Életképes, fertilis
da-Gal4/Dsk2 ^{RNSi}	Dsk2 ↓	Letális (farát adult)
da-Gal4/Dsk2 ^{Flag}	Dsk2 ↑	Letális (farát adult)
da-Gal4/ <i>Rad23^{RNSi}</i>	<i>Rad23</i> ↓	Életképes, fertilis
da-Gal4/ <i>Rad23^{Flag}</i>	<i>Rad23</i> ↑	Életképes, fertilis
da-Gal4/p54 ^{RNSi} /Dsk2 ^{RNSi}	p54 és Dsk2 ↓	Letális (korai báb)
da-Gal4/Strep-p54(7)/Dsk2 ^{Flag}	p54 és Dsk2 ↑	Életképes, fertilis
da-Gal4/p54 ^{RNSi} / <i>Rad23^{RNSi}</i>	p54 és <i>Rad23</i> ↓	Letális (korai báb)
da-Gal4/Strep-p54(7)/ <i>Rad23^{Flag}</i>	p54 és <i>Rad23</i> ↑	Életképes, fertilis

3. táblázat. A p54, Dsk2 és *Rad23* túltermelő- és csendesítő törzsek fenotípusának összefoglalása

Tehát az *in vivo* kísérletek az *in vitro* vizsgálatok eredményeit (31. és 32. ábra) támogatva azt bizonyítják, hogy *Drosophilában* az Dsk2 fehérje kölcsönhat a p54-gyel, és a poliubiquitilált

szubsztrátokat a p54-en keresztül szállítja a 26S proteasómához. Minthogy a p54-hez hasonlóan a Dsk2 koncentrációjának mesterséges megváltoztatása (RNS-interferencia, túltermeltetés, CTF-csapdázás) is letális, a Dsk2 mennyiségének nagyon finoman hangolt szabályozási mechanizmusára, s ezáltal a fehérje ubiquitin-proteasóma rendszerben betöltött esszenciális szerepére hívja fel a figyelmünket. Mivel a Rad23 túltermeltetése vagy csendesítése nem letális, valamint a Rad23-p54 között csak gyenge genetikai interakciót lehetett kimutatni, joggal feltételezhetjük, hogy *Drosophilában*, szemben az élesztővel, a fő extraproteasómális UBA/UBL poliubiquitin receptor a Dsk2. Ezért a p54 és Dsk2 szintjének megváltozása az egyedfejlődés folyamán az ubiquitin-proteasóma rendszer homeosztázisának felbomlásához és az állat halálához vezet.

A fenti eredményeinkkel párhuzamosan 2008 végén kimutatták, hogy a Dsk2 élesztőben is kapcsolódhat^{142,143} az Rpn10-hez (p54 ortológ). Ha túltermeltették a Dsk2-t, a sejtek elpusztultak, amit az Rpn10 egyidejű túltermeltetése menekített (hasonlóan, mint *Drosophilában*). A korábbiakkal ellentétben ma már egységesen elfogadott, hogy az Rpn10/S5a/p54 a proteasóma ingázó faktora¹⁷⁹ (mi neveztük így először). A legújabb modell szerint a proteasómáról levált (extraproteasómális) Rpn10/S5a/p54 képes befolyásolni a különböző poliubiquitin receptorok szállította szubsztrátok proteasómához történő transzportját. Ubiquitin interakciós motívuma (UIM) segítségével felismeri és megköti a szubsztrátot szállító Dsk2 ubiquitin-szerű doménjét (UBL), majd ha a 26S proteasóma szabad kapacitással rendelkezik, beszállítja a 19S regulátor komplexumhoz.

DISZKUSSZIÓ

Az eukarióták sejtjeiben a sérült, funkciót vesztett és feleslegessé vált fehérjék az ubiquitin-proteaszóma rendszer révén bomlanak le. Első lépésben egy degradációs jel (poliubiquitin-lánc) kapcsolódik a lebontandó fehérjére, amit a poliubiquitin receptorok felismernek, és a szubsztrátot a 26S proteaszóma multiprotein katalitikus komplexumhoz szállítják. A poliubiquitin receptorok (Rpn10/S5a/p54, Rad23, Dsk2, Ddi1 és Rpn13/p54E) működésének és regulációjának molekuláris részleteit, melynek egyaránt vannak általános és fajspecifikus elemei is, az elmúlt évtizedben kezdtük megismerni. Egérben pl. az Rpn10 poliubiquitin receptor egyedfejlődés-specifikus alternatív splicing-gal létrejött szerkezeti izoformái egy sor különböző Rpn10 tartalmú 26S proteaszóma létrejöttét eredményezik, amelyek szükségesek az állat megfelelő fejlődéséhez¹³⁵.

Kutatásaink során *Drosophila melanogasterben* egy másfajta szabályozásra lettünk figyelmesek. Két alapmegfigyelésből indultunk ki. Az első szerint a 19S regulátor komplex poliubiquitin receptor alegysége, a p54 két különböző konformációs állapotban van jelen a 26S proteaszómában (ezt a megfigyelést még nem sikerült értelmeznünk), ami felveti p54 poszttranszlációs módosulásának lehetőségét (12A. ábra). A második fontos észrevétel, miszerint embrióban a p54 sztöchiometrikus, míg lárvában szubsztöchiometrikus alegysége a 19S regulátor komplexumnak (12B-C. ábra), pedig azt sugallta, hogy a p54 fehérje szintje szabályozódik a *Drosophila* egyedfejlődése folyamán. Ezt bizonyítandó szinkronizált mintákat gyűjtöttünk 15 különböző fejlődési állapotból, és kimutattuk, hogy a p54 fehérje koncentrációja a többi proteaszóma alegységhez képest drasztikusan lecsökkent a korai lárvastádiumokban, és alacsony maradt egészen a kései harmadik stádiumos lárvakorig, amikor is visszanyerte eredeti szintjét, majd a báb és adult stádiumokra véglegesen stabilizálódott (13B. ábra). Ez a megfigyelés egyértelműen bizonyította, hogy a p54 poliubiquitin receptor az ontogenezis folyamán különböző mennyiségben van jelen a sejtben.

Az ezredforduló környékén kiderült, hogy az élesztő sejtek más típusú poliubiquitin receptorokkal is rendelkeznek^{76,115}. Szekvencia és szerkezeti homológia alapján megkerestük és expressziós vektorokba klónoztuk az élesztő UBA/UBL- (Rad23, Dsk2 és Ddi1), valamint a Prudomént tartalmazó (Rpn13/p42E) receptorainak feltételezett *Drosophila* ortológjait. Ezt követően pull-down kísérletekkel meghatároztuk a rekombináns fehérjék funkcionális egységeit, és

bizonyítottuk, hogy a muslica fő poliubiquitin receptorai a Rad23 és Dsk2 UBA/UBL fehérjék, valamint a proteaszóma saját alegysége a p54 (15. ábra). Kimutattuk, hogy az endogén Rad23 és Dsk2 szintje a p54-hez hasonlóan változik az egyedfejlődés folyamán (16. ábra), azaz lárvastádium-specifikusan eliminálódnak. Mindeközben sem génjeik aktivitása (18. ábra), sem pedig a poliubiquitilált szubsztrátjaik mennyisége (17. ábra) nem változik. Habár még nem teljesen ismerjük és értjük ennek a folyamatnak a biológiai jelentőségét, úgy gondoljuk, hogy az embrió korban az erős mitotikus aktivitás, a nagyfokú poliubiquitilált fehérje termelődés, a lárvális struktúrák hisztolízise a báb stádiumokban, valamint az adult állatok reprodukív aktivitásának biztosítása magasabb poliubiquitin receptor koncentrációt igényel, mint a hipoxiás környezetben fejlődő lárv szöveinek működése. Jelenleg folyó vizsgálataink célpontjában annak az elképzelésünknek a bizonyítása áll, hogy a lárvális stádiumban egy alternatív proteolitikus apparátus veszi át az ubiquitin-proteaszóma rendszer funkcióját.

In vitro degradációs kísérleteink eredményei szerint egy fejlődésstádium-specifikus proteolitikus rendszer felelős a poliubiquitin receptorok mennyiségének szabályozásáért, amely aktivitását a korai lárvastádiumokban nyeri el, és csak a kései lárvakorban, a bábbá válás előtt veszíti el. A folyamatban részt vevő proteáz képes a proteaszómális (p54) és extraproteaszómális (Rad23 és Dsk2) poliubiquitin receptorokat szelektíven lebontani, miközben a fehérjék zömét intakt állapotban hagyja (19. és 20. ábra). A szelektivitás újabb szintjét jelenti, hogy az *in vivo* és *in vitro* degradáció folyamán a p54-nek kizárólag a rendezetlen szerkezetű C-terminális fele emésztődik le, miközben a vWA-domént hordozó strukturált N-terminális fele sértetlenül, a 26S proteaszómához kapcsolódva megmarad (21. ábra). Ennek a szabályozásnak feltehetően az az oka, hogy a még intakt p54 fehérjék újbóli beépülése a regulátor komplexumba ne történhessen meg. Predikciós programok segítségével kimutattuk, hogy a módosítatlan Rad23 és Dsk2 fehérjékben is találhatók rendezetlen szerkezetű szakaszok. Ezért elképzelhetőnek tartjuk, hogy a korai lárvákban valamilyen mechanizmus hatására a strukturált poliubiquitin receptorok rendezetlen szerkezetűvé alakulnak specifikus degradációs jelet szolgáltatva egy erre evolválódott speciális proteáznak. Habár az élesztő Rpn10-ről (p54 ortológ) kimutatták, hogy poliubiquitilálódva a 26S proteaszóma szubsztrátjává válhat¹¹⁴, eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy muslicában a poliubiquitin receptorok degradálódását egy lárvaspecifikus szerin-proteáz végzi (20D. ábra). Nagy mennyiségű lárv-extraktumot felhasználva sikerült homogenitásig tisztítanunk, majd tömegspektrometriai módszerrel azonosítanunk egy

kimotripszinszerű szerin-proteázt, amely *in vitro* fajlagosan képes lebontani a rekombináns és endogén p54, Rad23 és Dsk2 fehérjéket. A mindmáig ismeretlen funkciójú szerin-proteáz *in vivo* és *in vitro* jellemzése jelenleg folyik.

Korábban kimutattuk⁹⁸, hogy *in vitro* a p54 képes ingázni a proteaszóma és az extraproteaszómális tér között. Az endogén p54 ezen tulajdonságát kihasználva sikerült kicserélnünk a proteaszóma p54 alegységét rekombináns p54-re. A csere csak akkor működött, ha a rekombináns fehérje legalább a p54-re jellemző vWA domént tartalmazta. Mivel nem volt bizonyítékunk arra, hogy a p54 *in vivo* is ingázik, szeretnénk volna megismerni azokat a változásokat is, amelyek hatására a reverzibilis disszociáció-reasszociáció megtörténik. Ennek érdekében Strep-p54-et, valamint annak N- (Strep-NTF) és C-terminális (Strep-CTF és CTF) szakaszát túltermelő transzgénikus *Drosophila* törzseket hoztunk létre (22. ábra). A muslicákkal végzett kísérletek célja az volt, hogy *in vivo* stabilizáljuk az endogén p54 extraproteaszómális állapotát további vizsgálódások céljából pl. azáltal, hogy a túltermeltetett fehérjékkel leszorítjuk a proteaszómáról. A Strep-p54 és Strep-NTF transzgénikus fehérjék a vWA domén révén kvantitatíve beépültek (*in vivo*) a proteaszómába (23. ábra), de ez nem okozta az endogén p54 extraproteaszómális felhalmozódását. Ennek oka feltehetően az lehet, hogy a proteaszómális gének koordinált szabályozása miatt a *Pros54* aktivitása lecsökkent, így a sejt nem termelt feleslegben endogén p54-et, vagy a proteaszóma gének aktivitása megnőtt, és a létrejött nagy mennyiségű 26S proteaszóma az összes p54-et (endogén és transzgénikus) begyűjtötte. A fenti stratégia így sajnos nem hozta meg a várt eredményt, ezért a p54 extraproteaszómális stabilizálását más irányból közelítettük meg. Létrehoztuk a p54 C-terminálisát (CTF) túltermelő transzgénikus állatokat. A CTF a vWA domén hiányában *in vivo* nem épült be a 26S proteaszómába, hanem extraproteaszómálisan, nagy moláris koncentrációban dúsult fel az sejtekben (24B. ábra), ami az állatok kései, harmadik lárvastádiumában bekövetkező pusztulásához vezetett. A letalitás okát nem ismertük, ezért átfogó vizsgálatokat indítottunk a jelenség értelmezésére. Mivel korábbi kísérleteinkből tudtuk, hogy az endogén p54 számos fehérjemodifikációban résztvevő enzimmel képes kölcsönhatásba lépni, fontosnak tartottuk annak tisztázását, hogy vajon az extraproteaszómálisan akkumulálódott CTF módosul-e?

Ennek érdekében egy újabb transzgénikus törzset hoztunk létre, amely a CTF affinitáskromatográfiával egy lépésben tisztítható, Strep-címkével fuzionált változatát képes túltermelni. A Strep-CTF hasonlóan a csupasz CTF-hez az extraproteaszómális térben

halmozódott fel és az állatok letalitását okozta. A lárvális extraktumból kitisztított Strep-CTF-ről biokémiai és tömegspektrometriai módszerekkel bebizonyítottuk, hogy *in vivo* mono-, illetve oligoubiquitilálódott (25. és 26. ábra). Habár az élesztő p54 ortológjáról, az Rpn10-ről kimutatták, hogy poliubiquitilálódhat, ami a fehérje gyors (45 perc) lebontásához vezet¹¹⁴, kísérleteinkben egyértelműen bizonyítottuk, hogy a CTF-en végbemenő módosítás nem poliubiquitiláció és nem degradációs szignál, hiszen a transzgénikus fehérje féléletideje hosszabb volt 2 napnál. Ezt követően egy új transzgénikus konstrukciót, a Strep-CTF-ΔK-t felhasználva sikeresen igazoltuk a CTF terminális konzervált lizinjeinek szükségességét a CTF ubiquitilálódásának folyamatában. A terminális lizinek hiányában a Strep-CTF-ΔK nem ubiquitilálódott (25C. ábra), s habár felhalmozódott az extraproteasómális térben, nem okozta az állatok halálát.

A mono- és oligoubiquitiláció általában valamilyen finoman hangolt biológiai funkció kibekapcsolását okozza. Feltehetően a proteasómához kapcsolt endogén p54 C-terminális rendezetlen szerkezetű része a kölcsönható alegységek védelme alatt áll, majd a disszociáció előtt ubiquitilálódik (egy eddig ismeretlen ubiquitin-ligáz hatására), minek következtében megváltozik a konformációja, ami az extraproteasómális p54 strukturáltságát és működőképességét biztosítja. Ezt az elképzelést bizonyítja, hogy ha Strep-CTF, Strep-CTF-ΔK és CTF túltermelő állatok natív fehérjeextraktumában lévő strukturált fehérjéket forralással kicsaptuk (a rendezetlen szerkezetű fehérjék nem precipitálódnak, hanem a felülúszóban maradnak), akkor a centrifugálásból visszamaradt híg fehérjeoldatból csak a Strep-CTF, Strep-CTF-ΔK és CTF fehérjéket lehetett kimutatni, de a Strep-CTF 25A. ábrán bemutatott ubiquitilált formáit nem. Ezen ubiquitilálatlan formák féléletideje viszont extrém rövid volt, lárvá-extraktumban történő néhány perces inkubációt követően teljes mértékben lebomlottak (nem bemutatott eredmény). Vagyis a mono- és oligoubiquitilálódott transzgénikus fehérjék strukturálttá és hosszú életidejűvé váltak (27. ábra), míg a módosítatlan formáik megtartották rendezetlen szerkezetüket és ezzel együtt proteáz-érzékenységüket. Összefoglalva a fentieket megállapíthatjuk, hogy az extraproteasómálisan felhalmozódott CTF transzgénikus fehérjék terminális lizinjeinek mono- és/vagy oligoubiquitilációja nem degradációs jel, hanem a CTF strukturáltságát, hosszú féléletidejét és szabályozását irányítja. Habár a folyamat résztvevőit ma még nem ismerjük, és biológiai jelentőségére csak következtetni tudunk, úgy gondoljuk, hogy a mono/oligoubiquitilálódott endogén p54 C-terminálisa strukturálttá válik, ezután a p54 leválik a proteasómáról, és

valamilyen esszenciális funkciót lát el. Eközben a szabadon maradt, de mono/oligoubiquitilálódott C-terminális a proteázokkal szemben védetté válik. A fenti megfontolásból kiindulva arra következtettünk, hogy a toxikus Strep-CTF és CTF felhalmozódása és a terminális lizinjeinek módosulása megzavarhatja a disszociált endogén p54 fehérjét ubiquitiláló enzimek működését, minek hatására felbomlik az egyensúly a p54 ingázásának és extraproteasómális funkciójának rendszerében, és az állat elpusztul.

Kísérleteinkben egyértelműen kimutattuk, hogy a CTF-túltermelő da-Gal4/C18 transzgénikus állatokban zavart szenved a poliubiquitin receptorok fejlődésszádium-specifikus szabályozása. Az ubiquitilált és akkumulálódott CTF hatására a normálishoz képest (29A. ábra) korábbi lárvastádiumban szűnik meg az a szerin-proteáz aktivitás (génjének kifejeződése gátlődik), ami a poliubiquitin receptorok degradációját irányítja, ezért a p54, Dsk2 és Rad23 nem a kései, hanem már a korai L3 stádiumban feldúsul (29B. ábra). Érdekes módon a poliubiquitin receptorok felhalmozódását a poliubiquitilált fehérjék akkumulálódása (30. ábra) kísérte. Ezt a látszólagos paradoxont számos irodalmi adat is alátámasztja, melyek szerint a poliubiquitin receptorok egymáshoz viszonyított koncentrációjának bármilyen megváltozása az ubiquitin-proteasóma rendszer működésének komoly zavarát okozza, amit mindig a poliubiquitilált fehérjék felhalmozódása követ^{173-176,140,142}. Kutatásaink során kimutattuk, hogy a poliubiquitilált szubsztrátok feldúsulását a CTF-túltermelő állatban nem csak az endogén poliubiquitin receptorok koncentrációjának megváltozása, valamint a p54 módosulási folyamatainak és proteasómától független biológiai funkcióinak sérülése, hanem az endogén p54 szubsztrátjainak CTF általi csapdába ejtése, valamint egy másik poliubiquitin receptor, a Dsk2 extraproteasómális felhalmozódása (31. ábra) is elősegíti. Vad típusú állatokban az endogén Dsk2 monomer és proteasómához kötött állapotban is jelen van (31A. ábra) – azaz kölcsönhat a 26S proteasómával, és szubsztrátokat szállít neki. Mivel az endogén Dsk2-t a CTF-et túltermelő transzgénikus állatokban nem a proteasómális, hanem szinte kizárólag a CTF-et is tartalmazó monomer fehérjefrakciókban lehetett kimutatni, azt feltételeztük, hogy a Dsk2 kölcsönhat a p54 C-terminális felével. Vagyis az extraproteasómálisan stabilizálódott, nagy moláris koncentrációban jelen levő CTF kititrálta az endogén Dsk2-t megakadályozva a Dsk2-specifikus szubsztrátok eljutását a 26S proteasóma holoenzimhez, ami a poliubiquitilált fehérjék felhalmozódásának fő oka lehetett. *In vitro* pull-down kísérletekben használt rekombináns Dsk2 és p54 csonkolt darabokkal igazoltuk, hogy a muslica Dsk2 ubiquitin-szerű doménje (UBL)

valóban nagy affinitással képes megkötni a p54 harmadik (és/vagy második) UIM-át. A folyamat *in vivo* bizonyítására genetikai interakciós kísérleteket végeztünk. Ha a p54 és a Dsk2 fehérjék mennyiségét az RNS-interferencia adta lehetőségeket kihasználva transzgénikus muslicákban külön-külön lecsökkentettük, akkor a poliubiquitilált fehérjék felhalmozódtak, és az állatok közvetlenül az adulttá válás előtt, a farát adult bábstádiumban elpusztultak. Ha a két gén csendesítését egyszerre egy törzsön belül indukáltuk, akkor a poliubiquitilált szubsztrátok felhalmozódása drasztikusabb volt, és a mutánsok korábbi bábstádiumokban pusztultak el, – azaz genetikai interakció áll fenn a két gén között. Habár az élesztő Dsk2 és p54 interakcióról^{142,143} két tavaly megjelent közleményben már beszámoltak, magasabbrendű multicelluláris organizmusban az első *in vitro* és *in vivo* bizonyítékot a fenti kísérleteink szolgáltatták.

Az elvégzett *in vitro* és *in vivo* kísérletek eredményei alapján a következő működési modellt állítottuk össze (9B. ábra): a p54-nek kétféle funkcionális és strukturális változata van jelen a 26S proteaszómában. Az egyik populáció poliubiquitin receptorként működve ubiquitin-interakciós motívumaival összegyűjti a K48-as poliubiquitin láncsal megjelölt fehérjét, és a regulátor komplexumnak továbbadja. A másik p54 csoport pl. poszttranszlációs módosítás és/vagy egyéb hatások következtében disszociál a proteaszómáról – ingázó faktor (proteaszóma találkozókon ma már így hívják az Rpn10/S5a/p54-et). A szabad p54 rendezetlen szerkezetű része a terminális lizinek ubiquitilációja következtében védetté válik a citoszolikus proteázokkal szemben, így a p54 zavartalanul végezheti extraproteaszómális feladatát. Egy 2009-es barcelonai konferencián Crosas és munkatársai nagyon érdekes eredményeket közöltek. Kimutatták, hogy az élesztő Rpn10, amelyben nincsenek konzervált terminális-, csak internális lizinek, az Rsp5 ubiquitin-ligáz hatására specifikusan monoubiquitilálódik, míg az Ubp2 DUB hatására deubiquitilálódik¹⁸⁰ (sajnos egyiknek sincs *Drosophila* ortológja). A monoubiquitiláció az Rpn10-et inaktíválja azáltal, hogy az ubiquitin kölcsönhatásba lép az Rpn10 egyetlen UIM-ával. Ez a megfigyelés egy újabb regulációs szintet vezetett be a proteaszóma működésébe. Ezért elképzelhetőnek tartjuk, hogy a *Drosophila* p54 terminális lizinjein végbemenő ubiquitilációnak szerepe lehet abban is, hogy a disszociált és stabilizált extraproteaszómális p54 poliubiquitin-lánc kötő UIM-át (pl. UIM1) inaktíválja, miközben az UIM2 és UIM3 exponáltabb helyzetbe kerül. Talán ez a folyamat szükséges a szubsztráttal töltött Dsk2 megkötéséhez, a 19S regulátor komplexum Rpn1/2 felszínre történő szállításához és/vagy az üres Dsk2 proteaszómából való kizárásához.

Ma úgy gondoljuk, hogy az ubiquitin-proteaszóma rendszer aktivitása különböző a *Drosophila* ontogenezise folyamán. A lárvális korszakban az állat aktivitása kizárólag a táplálkozásra korlátozódik, annak érdekében, hogy az öt napig tartó bábstádiumban bekövetkező teljes átalakulásra felkészüljön. A lárvákban az embrió és bábkorhoz képest lecsökken a sejtek mitotikus aktivitása, ami szignifikánsan csökkenti a poliubiquitilált fehérjék mennyiségét a sejtben. Specifikus szubsztrátok hiányában a sok energiát igénylő és finom szabályozáshoz szokott ubiquitin-proteaszóma rendszer üzemeltetése már nem éri meg a sejt számára akkor sem, ha a lárva hipoxiás élőhelyéből (táptalaj vagy gyümölcs) adódóan megnövekszik a proteóm denaturált fehérje tartalma (eukarióta sejtekben az egyetlen ismert denaturált fehérje eltávolító protein minőségellenőrző mechanizmus a proteaszómához kapcsolt ERAD^{53,57}, amelyet mindmáig kizárólag az endoplazmatikus retikulumban sikerült kimutatni). Tehát inaktiválódik az ubiquitin-proteaszóma rendszer, melynek legegyszerűbb és „legolcsóbb” módja a poliubiquitin receptorok lebontása. Ezt követően egy másik rendkívül gyors, ám durvábban működő proteolitikus rendszer veszi át a helyét, ami a keletkező denaturálódott fehérjéket hatékonyan eltávolítja. A kísérleti eredményeink szerint a poliubiquitin receptorokat specifikus, lárvában aktiválódó szerin-proteáz bontja le. Habár nem ismerjük a szabályozás minden részletét és molekuláris elemét, feltételezzük, hogy e szerin-proteáznak valamiféle kapcsolata van a p54 ingázásával vagy az azt irányító ubiquitilációs rendszerrel. Erre utal az a tény is, hogy ha a p54 C-terminális felét (CTF), amely nem képes beépülni a proteaszómába, túltermeltetjük transzgénikus állatokban, az ubiquitilálódott CTF a szelektív proteolitikus aktivitást gátolja, ami a poliubiquitin receptorok és poliubiquitilált szubsztrátok felhalmozódásához és az állat kései L3-ban bekövetkező pusztulásához vezet.

Kísérleti következtetéseinket egy elfogadott¹³² tudományos közleményben és két (jelenleg) kéziratban foglaltuk össze. Az értekezésben bemutatott, valamint a nem részletezett, jelenleg is folyó *in vitro* és *in vivo* munkák eredménye hozzájárulhat egy magasabbrendű eukarióta organizmusban az ubiquitin-proteaszóma rendszer poliubiquitilált fehérjeszubsztrátjait felismerő és szállító rendszer működési mechanizmusainak pontosabb megértéséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

„Egyetlen tudós sem léphet ki a semmiből, elődök nélkül, de ellentétben a vér szerinti fiúval, a szellemi gyermek legalább megválaszthatja szüleit.”

(Selye János: Álomtól a felfedezésig)

Hálás köszönet és mély tisztelet illeti tanáromat és témavezetőmet **Dr. Udvardy Andort** elméleti és gyakorlati tanácsaiért, odafigyeléséért és türelméért. A gondolkodásra és precizitásra késztető törekvései esszenciális alapját képezik a mindennapi munkámnak, valamint nagymértékben hozzásegítettek közös kísérleti eredményeink és jelen értekezés megszületéséhez.

Köszönöm **Udvardy Katalinnak** a kísérletek előkészítésében nyújtott segítségét. Precizitása és kiterjedt figyelme mindannyiunk munkáját elősegíti. Továbbá sok köszönettel tartozom **Dr. Kiss Petrának**, amiért bevezetett a molekuláris biológia gyakorlati alkalmazásába, és készségesen rendelkezésemre bocsátotta transzgénikus törzseit (C18, 8SC és Strep-NTF) és eredményeit (2D IEF-SDS-PAGE). Köszönet illeti továbbá **Dr. Szabó Áront** a Strep-p54(7) törzsért és hasznos tanácsaiért, **Dr. Pál Margitot** a muslicagenetikában nyújtott segítségéért és az injektlásért, **Dr. Deák Pétert**, amiért lehetővé tette számomra a mikroszkópos munkát genetikai műhelyében, az MTA SZBK Proteomikai Csoportját, különösen **Dr. Medzihradszky F. Katalint**, **Dr. Hunyadi Gulyás Évát** és **Klement Évát** az ubiquitiláció kimutatásában nyújtott segítségükért.

Hálával tartozom tanárainnak, akik egy a pályája elején álló kutató jelöltnek helyes utat mutatva megszerettették velem a biológia világát.

Végül, de nem utolsó sorban tisztelet illeti **Lipinszki Ugró Tímeát** türelméért, bátorításaiért és mindenekelőtt kitartó jelenlétéért.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Bryan Sykes (2002). Éva hét leánya. Európa könyvkiadó
2. Charles Darwin (2001). A fajok eredete. Természetes kiválasztás útján. Typotex Kiadó
3. Kennedy., E.P. (2001). Hitler's gift and the era of biosynthesis. J. Biol. Chem. 276, 42619–42631.
4. Schoenheimer, R., Ratner, S., and Rittenberg, D. (1939). Studies in protein metabolism. VII: The metabolism of tyrosine. J. Biol. Chem. 127, 333–344.
5. Ratner, S., Rittenberg, D., Keston, A.S., and Schoenheimer, R. (1940). Studies in protein metabolism. XIV: The chemical interaction of dietary glycine and body proteins in rats. J. Biol. Chem. 134, 665–676.
6. Monod, J. (1966). From enzymatic adaptation to allosteric transitions. Science. 154(748), 475–83.
7. Hogness, D.S., Cohn, M., and Monod, J. (1955). Studies on the induced synthesis of, beta-galactosidase in Escherichia coli: The kinetics and mechanism of sulfur incorporation. Biochim. Biophys. Acta 16, 99–116.
8. Schoenheimer, R. The Dynamic State of Body Constituents (1942). Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
9. de Duve, C., Gianetto, R., Appelmans, F., and Wattiaux, R. (1953). Enzymic content of the mitochondria fraction. Nature (London) 172, 1143–1144.
10. Simpson, M.V (1953). The release of labeled amino acids from proteins in liver slices. JBC. 201, 143–154.
11. Ashford, T.P., and Porter, K.R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. JCB. 12, 198–202.
12. Mortimore, G.E., and Poso, A.R. (1987). Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. Annu. Rev. Nutr. 7, 539–564.
13. Goldberg, A.L., and St. John, A.C. (1976). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. Annu. Rev. Biochem. 45, 747–803.
14. Hershko, A. and Tomkins, GM. (1971). Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence. J Biol Chem. 10;246(3):710-4.
15. Goldspink, DF. and Goldberg, AL. (1973). The apparent stimulation of proteolysis by adenosine triphosphate in tissue homogenates. Biochem J. 134(3):829-32.
16. Segal, H.L., Winkler, J.R. and Miyagi, M.P. (1974). Relationship between degradation rates of proteins in vivo and their susceptibility to lysosomal proteases. J. Biol. Chem. 249, 6364–6365.
17. Hayashi, M., Hiroi, Y. and Natori, Y. (1973). Effect of ATP on protein degradation in rat liver lysosomes. Nature New Biol. 242, 163–166.
18. Rabinovitz, M. and Fisher, J.M. (1964). Characteristics of the inhibition of hemoglobin synthesis in rabbit reticulocytes by threo-amino-chlorobutyric acid. Biochim. Biophys. Acta. 91, 313–322.
19. Etlinger, J.D. and Goldberg, A.L. (1977). A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. PNAS. USA 74, 54–58.

20. Hershko, A.m Heller, H., Ganoth, D., and Ciechanover, A. (1978). Mode of degradation of abnormal globin chains in rabbit reticulocytes. *Protein Turnover and Lysosome Function*. Academic Press, NY. pp. 149–169.
21. Poole, B., Ohkuma, S. and Warburton, M.J. (1977). The accumulation of weakly basic substances in lysosomes and the inhibition of intracellular protein degradation. *Acta Biol. Med. Germ.* 36, 1777–1788
22. Ciechanover A., Hod Y. and Hershko A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 81(4):1100-5.
23. Hershko, A., Ciechanover, A. and Rose, IA.(1979). Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *PNAS. USA* 76, 3107-10.
24. Ciechanover A, Elias S, Heller H, Ferber S and Hershko A. (1980). Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J Biol Chem.* 255(16):7525-8.
25. Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL and Hershko A.(1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *PNAS. USA* 77, 1365-1368
26. Wilkinson KD, Urban MK and Haas AL. (1980). Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem.* 255(16):7529-32.
27. Hershko A., Heller H., Elias S. and Ciechanover A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification and role in protein breakdown. *J.Biol.Chem.* 258 (13):8206-14
28. Hough, R., Pratt, G. and Rechsteiner, M. (1986). Ubiquitin-Lysozyme Conjugates: Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 261,(5), 2400-8.
29. Hough, R., Pratt, G. and Rechsteiner, M. (1987). Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem.* 262(17):8303-13.
30. Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature.* 458(7237):422-9. Review.
31. Pickart, CM. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell.* 116(2):181-90. Review.
32. Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *BBA* 1695, 55–72.
33. Varshavsky, A. (2005). Regulated protein degradation. *Trends Biochem. Sci.* 30, 283–286.
34. Peng, J., Schwartz, D., Elias, JE., et. al. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21: 921–926
35. Wilkinson KD and Audhya TK. (1981). Stimulation of ATP-dependent proteolysis requires ubiquitin with the COOH-terminal sequence Arg-Gly-Gly. *J Biol Chem.* 256(17):9235-41.
36. Hershko A, Ciechanover A and Rose IA. (1981). Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J Biol Chem.* 256(4):1525-8.
37. Finley D, Bartel B and Varshavsky A. (1989). The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature.* 338(6214):394-401.
38. Jung T, Catalgol B and Grune T. (2009). The proteasomal system. *Mol Aspects Med.* 30(4):191-296.
39. Ciechanover A, Elias S, Heller H and Hershko A. (1982) "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem.* 257(5):2537-42.

40. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL and Rose IA. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. PNAS. USA 77(4):1783-6.
41. Ciechanover A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. The EMBO Journal 17 (24) 7151-7160
42. Fang, S. and Weissman, AM. (2004). A field guide to ubiquitylation. Cell Mol Life Sci. 61(13):1546-61.
43. Varshavsky, A. (2006). The early history of the ubiquitin field. Protein Sci. 15(3):647-54
44. Barbash O and Diehl JA. (2008). SCF E3 ligase: when one is not enough. Cell Cycle. 7(19):2983-6.
45. Pál M, Nagy O, Ménesi D, Udvardy A and Deák P. (2007). Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase-promoting complex in *Drosophila melanogaster*. J Cell Sci. 120(Pt 18):3238-48.
46. Woelk T, Sigismund S, Penengo L and Polo S. (2007). The ubiquitination code: a signaling problem. Cell Div. 2:11
47. Ravid T and Hochstrasser M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. Nat Rev Mol Cell Biol. p(9):679-90. Review.
48. Hoppe T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. Trends Biochem Sci. 30(4):183-7. Review.
49. Li W and Ye Y. (2008). Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. Cell Mol Life Sci 65(15):2397-406. Review.
50. Ben-Saadon R, Zaaroor D, Ziv T and Ciechanover A. (2006). The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. Mol Cell. 24(5):701-11.
51. Pickart, CM. and Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains-polymericprotein signals. Curr Opin Chem Biol 8: 610-16
52. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M and Pickart CM (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. EMBO J 19:94–102
53. Germain D. (2008). Ubiquitin-dependent and -independent mitochondrial protein quality controls: implications in ageing and neurodegenerative diseases. Mol Microbiol. 70(6):1334-41..
54. Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O and Sommer T. (2009). The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. Nature. 458(7237):453-60. Review.
55. Saeki Y, Kudo T, Sone T, Kikuchi Y, Yokosawa H, Toh-e A and Tanaka K. (2009). Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. EMBO J. 28(4):359-71.
56. Huang TT and D'Andrea AD. (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol 7(5):323-334.21.
57. Tanaka K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.85(1):12-36. Review.
58. Ventii, K. H. and Wilkinson, K. D. (2008). Protein partners of deubiquitinating enzymes. Biochem. J. 414, 161–175.

59. Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a selfcompartmentalizing protease. *Cell* 92, 367–380.
60. D. Voges, P. Zwickl, and W. Baumeister. (1999). THE 26S PROTEASOME: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annual Review of Biochemistry* Vol. 68: 1015-1068
61. Zwickl P, Seemuller E, Kapelari B and Baumeister W. (2001). The proteasome: a supramolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Adv. Protein Chem.* 59:187-222. Review
62. Collins GA and Tansey WP. (2006). The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev.* 16(2):197-202.
63. Murata S, Yashiroda H and Tanaka K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(2):104-15. Review.
64. Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J and Rivett J. (2000). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J.* 346 Pt 1:155-61.
65. DeMartino, G.N. and Gillette, T.G. (2007). Proteasomes: Machines for all reasons. *Cell* 129: 659-662.
66. Mishto M, Santoro A, Bellavista E, Bonafé M, Monti D and Franceschi C. (2003). Immunoproteasomes and immunosenescence. *Ageing Res Rev.* 2(4):419-32. Review.
67. Kloetzel PM. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol.* 5(7):661-9.
68. Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K and Ichihara A. (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* 360(6404):597-9.
69. Tompa P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* 27(10):527-33. Review.
70. Dyson HJ and Wright PE. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(3):197-208. Review.
71. Tsvetkov P, Asher G, Paz A, Reuven N, Sussman JL, Silman I and Shaul Y. (2008). Operational definition of intrinsically unstructured protein sequences based on susceptibility to the 20S proteasome. *Proteins* 70(4):1357-66.
72. Saeki Y, Toh-E A, Kudo T, Kawamura H and Tanaka K. (2009). Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. *Cell.* 137(5):900-13.
73. Hoeller D and Dikic I. (2009). Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature.* 458(7237):438-44.
74. Hartmann-Petersen, R. and Gordon, C. (2004). Proteins interacting with the 26S proteasome. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 1589-1595.
75. Schmidt M, Hanna J, Elsasser S and Finley D. (2005): Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol Chem.* 386(8).725-37. Review.
76. Finley D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem.* 78:477-513.
77. Dohmen RJ, Willers I and Marques AJ. (2007). Biting the hand that feeds: Rpn4-dependent feedback regulation of proteasome function. *Biochim Biophys Acta.* 1773(11):1599-604..

78. Harris, JR. (1968). Release of a macromolecular protein component from human erythrocyte ghosts. *Biochim Biophys Acta*. 150(3):534-7.
79. Hase J, Kobashi K, Nakai N, Mitsui K, Iwata K, and Takadera T. (1980). The quaternary structure of carp muscle alkaline protease. *Biochim Biophys Acta*. 611(1):205-13.
80. Arrigo, AP., Tanaka, K., Goldberg, AL. and Welch, WJ. (1988). Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells. *Nature*. 331(6152):192-4.
81. Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Nidel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R. and Baumeister, W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria. *FEBS Lett*. 251(1-2):125-31.
82. Tamura T, Nagy I, Lupas A, Lottspeich F, Cejka Z, Schoofs G, Tanaka K, De Mot R and Baumeister W. (1995). The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol*. 5(7):766-74.
83. Volker, C. and Lupas, A. N. (2002). Molecular evolution of proteasomes. *Curr. Top. Microb. Imm.* 268,1-22
84. Rosenzweig, R. and Glickman, MH. (2008). Chaperone-driven proteasome assembly. *Biochem. Soc Trans.* 36(5):807-12.
85. Ramos, PC and Dohmen, RJ (2008). PACemakers of proteasome core particle assembly. *Structure* 16,1296-1304
86. Arendt, C. S. and Hochstrasser, M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *PNAS. USA* 94, 7156-7161.
87. Heinemeyer, W., Ramos, P. C. and Dohmen, R. J. (2004). The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1562-1578.
88. Murata, S., Takahama, Y. and Tanaka, K. (2008). Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr. Opin. Immunol.* 20,192-196.
89. Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH and Finley D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 7:1062-67
90. Eytan E, Ganot D, Armon T and Hershko A. (1989). ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *PNAS. USA* 86(20):7751-5.
91. Hoffman L, Pratt G and Rechsteiner M. (1992). Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem*. 267(31):22362-8.
92. Udvardy A. (1993). Purification and characterization of a multiprotein component of the *Drosophila* 26 S (1500 kDa) proteolytic complex. *J Biol Chem*. 268(12):9055-62.
93. Chu-Ping M, Vu JH, Proske RJ, Slaughter CA and DeMartino GN. (1994). Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J Biol Chem*. 269(5):3539-47.
94. Glickman MH, Rubin DM, Fried VA and Finley D. (1998). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol*. 18(6):3149-62.
95. Hölzl H, Kapelari B, Kellermann J, Seemüller E, Sümegi M, Udvardy A, Medalia O, Sperling J, Müller SA, Engel A and Baumeister W. (2000). The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a eubiquitylating enzyme. *J Cell Biol*. 150(1):119-30.

96. Haracska, L., and A. Udvardy. (1996). Dissection of the regulator complex of the *Drosophila* 26S protease by limited proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:166–170.
97. Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A. and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin conjugate degradation and related to the COP9 signalosome and eIF3. *Cell* (Cambridge, Mass.) 94, 615–623
98. Kiss, P., Szabó, Á., Hunyadi-Gulyás, É., Medzihradsky, K.F., Lipinski, Z. and Udvardy A. (2005). Zn²⁺-induced reversible dissociation of subunit Rpn10/p54 of the *Drosophila* 26S proteasome. *Biochem. J.* 391: 301-310.
99. Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R. 3rd, Koonin, E. V. and Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611–615.
100. Yao, T. and Cohen, RE. (2002). Acryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419:403–7
101. Wilkinson, K.D. (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* 11:1245–1256.
102. Scheel H, Hofmann K. (2005). Prediction of a common structural scaffold for proteasome lid, COP9-signalosome and eIF3 complexes. *BMC Bioinformatics* 6:71
103. Forster A, Masters EI, Whitby FG, Robinson H and Hill CP. (2005). The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol. Cell* 18:589–99
104. Smith DM, Chang S-C, Park S, Finley D, Cheng Y and Goldberg AL. (2007). Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol. Cell* 27:731–44
105. Rabl J, Smith DM, Yu Y, Chang S-C, Goldberg AL, and Cheng, Y. (2008). Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol. Cell* 30:360–68
106. Koehler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL and Finley D. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 7:1143–1152
107. Szabó, Á., Pál, M., Deák, P., Kiss, P., Újfaludi, Zs., Pankotai, T., Lipinski Z. and Udvardy, A. (2007). Molecular characterization of the Rpt1/p48B ATPase subunit of the *Drosophila melanogaster* 26S proteasome. *Mol. Genet Genomics.* 278(1):17-29.
108. Smith DM, Benaroudj N and Goldberg A. (2006). Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination. *J Struct Biol.* 156(1):72-83.
109. Kajava AV. (2002). What curves α -solenoids? Evidence for an α -helical toroid structure of Rpn1 and Rpn2 proteins of the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 277:49791–98
110. Rosenzweig R, Osmulski PA, Gaczynska M, and Glickman MH. (2008). The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:573–80
111. Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Müller B, Feng MT, Tübing F, Dittmar GA and Finley D. (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat. Cell Biol.* 4:725–30

112. Hiyama H, Yokoi M, Masutani C, Sugasawa K, Maekawa T, Tanaka K, Hoeijmakers JH and Hanaoka F. (1999). Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome. *J Biol Chem.* 274(39):28019-25.
113. Leggett DS, Hanna J, Borodovsky A, Crosas B and Schmidt M. (2002). Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol. Cell* 10:495–507
114. Crosas, B., Hanna, J., Kirkpatrick, D.S., Zhang, D.P., Tone, Y., Hathaway, N.A., Buecker, C., Leggett, D.S., Schmidt, M., King, R.W., Gygi, S.P. and Finley D. (2006). Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell* 127: 1401-1413.
115. Wilkinson, C.R.M., Seeger, M., Hartman-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C. and Gordon, C. (2001). Proteins containing UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat. Cell Biol.* 3, 939-943.
116. Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL and Pickart CM. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416:763–67
117. Archer CT, Burdine L, Liu B, Ferdous A, Johnston SA, et al. (2008). Physical and functional interactions of monoubiquitylated transactivators with the proteasome. *J. Biol. Chem.* 283:21789–98
118. Deveraux Q, Ustrell V, Pickart CM and Rechsteiner M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* 269:7059–61
119. Haracska, L. and Udvardy, A. (1995). Cloning and sequencing a non-ATPase subunit of the regulatory complex of the *Drosophila* 26S protease. *Eur. J. Biochem.* 231: 720-725.
120. van Nocker S, Deveraux Q, Rechsteiner M and Vierstra RD. (1996). *Arabidopsis* MBP1 gene encodes a conserved ubiquitin recognition component of the 26S proteasome. *PNAS. USA* 93(2):856-60.
121. van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. and Vierstra, R.D. (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol. Cell. Biol.* 11: 6020-6028.
122. Fu H, Reis N, Lee Y, Glickman MH and Vierstra RD. (2001). Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J.* 20:7096–107
123. Haracska L and Udvardy A. (1997). Mapping the ubiquitin-binding domains in the p54 regulatory complex subunit of the *Drosophila* 26S protease. *FEBS Lett.* 412(2):331-6.
124. Fu, H., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D. and Vierstra, R.D. (1998). Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26S proteasome subunit Mub1. *J. Biol. Chem.* 273: 1970-1981.
125. Young P, Deveraux Q, Beal RE, Pickart CM and Rechsteiner M. (1998). Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26S protease subunit 5a. *J. Biol. Chem.* 273:5461–67
126. Hurley JH, Lee S and Prag G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochem J.* 399(3):361-72
127. Fisher, R. D., Wang, B., Alam, S. L., Higginson, D. S., Robinson, H., Sundquist, W. I. and Hill, C. P. (2003). Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J. Biol. Chem.* 278, 28976–28984
128. Shekhtman, A. and Cowburn, D. (2002). A ubiquitin-interacting motif from Hrs binds to and occludes the ubiquitin surface necessary for polyubiquitination in monoubiquitinated proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1222–1227

129. Uchiki T, Kim HT, Zhai B, Gygi SP, Johnston JA, O'Bryan JP and Goldberg AL. (2009). The ubiquitin-interacting motif protein, S5a, is ubiquitinated by all types of ubiquitin ligases by a mechanism different from typical substrate recognition. *J Biol Chem.* 284(19):12622-32.
130. Babbitt, S.E., Kiss, A., Deffenbaugh, A.E., Chang, Y-H., Bailly, E., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Buranda, T., Sklar, L.A., Baumler, J., Gogol, E. and Skowrya, D. (2005). ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. *Cell* 121: 553-565.
131. Yeh ET. (2009). SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J Biol Chem.* 284(13):8223-7.
132. Lipinszki, Z., Kiss, P., Pál, M., Deák, P., Szabó, Á., Hunyadi-Gulyas, E., Klement, E., Medzihradsky, KF. and Udvardy, A. (2009). Developmental-stage specific regulation of the polyubiquitin receptors in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci.* 122(Pt 17):3083-92.
133. Szlanka, T., Haracska, L., Kiss, I., Deák, P., Kurucz, E., Andó, I., Virágh, E. and Udvardy, A. (2003). Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci.* 116(Pt 6):1023-33.
134. Hamazaki, J., Sasaki, K., Kawahara, H., Hisanaga, S., Tanaka, K. and Murata, S. (2007). Rpn10-mediated degradation of ubiquitinated proteins is essential for mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 27: 6629-6638.
135. Kawahara, H., Kasahara, M., Nishiyama, A., Ohsumi, K., Goto, T., Kishimoto, T., Saeki, Y., Yokosawa, H., Shimbara, N., Murata, S. et al. (2000). Developmentally regulated, alternative splicing of the Rpn 10 gene generates multiple forms of 26S proteasomes. *EMBO J.* 19, 4144-4153.
136. Hofmann K and Falquet L. (2001). A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci.* 26(6):347-50.
137. Wang Q, Young P and Walters KJ. (2005). Structure of S5a bound to monoubiquitin provides a model for polyubiquitin recognition. *J. Mol. Biol.* 348:727-39
138. Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, TJ., Babiychuk, E., Kushnir, S., and Vierstra, RD. (2003). The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in *Arabidopsis* growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *Plant Cell.* 15(4):965-80.
139. Lambertson, D., Chen, L. and Madura, K. (1999). Pleiotropic defects caused by loss of proteasome-interacting factors Rad23 and Rpn10 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 153: 69-79.
140. Verma, R., Oania, R., Graumann, J. and Deshaies, R.J. (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 118: 99-110.
141. Kang, Y., Zhang, N., Koepp, DM. and Walters, KJ. (2007). Ubiquitin receptor proteins hHR23a and hPLIC2 interact. *J Mol Biol.* 365(4):1093-101.
142. Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D.S., Ziv, I., Kim, W., Dakshinamurthy, A., Kleifeld, O., Gygi, S.P., Reis, N. and Glickman, M.H. (2008). Extraproteasomal Rpn10 Restricts Access of the Polyubiquitin-Binding Protein Dsk2 to Proteasome. *Mol. Cell* 32: 415-425.
143. Walters, KJ. and Zhang, N. (2008). Rpn10 protects the proteasome from Dsk2. *Mol Cell.* 32(4):459-60.
144. Schaubert, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., et al. (1998). Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* 391:715-18
145. Chen, L. and Madura, K. (2002). Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 22:4902-13

146. Sasaki, T., Funakoshi, M., Endicott, J.A. and Kobayashi, H. (2005). Budding yeast Dsk2 protein forms a homodimer via its C-terminal UBA domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 336(2):530-5.
147. Kaplun, L., Tzirkin, R., Bakhrat, A., Shabek, N., Ivantsiv, Y., et al. (2005). The DNA damage-inducible UbLUBA protein Ddi1 participates in Mec1-mediated degradation of Ho endonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 25:5355–62
148. Kaplun, L., Tzirkin-Goldin, R., Shabek, N. and Raveh, D. (2006).. Unique role for the UbL-UbA protein Ddi1 in turnover of SCFUfo1 complexes. *Mol. Cell. Biol.* 26:1579–88
149. Dantuma, NP., Heinen, C. and Hoogstraten, D. (2009). The ubiquitin receptor Rad23: at the crossroads of nucleotide excision repair and proteasomal degradation. *DNA Repair (Amst).* 8(4):449-60.
150. Liu, Y., and Xiao, W. (1997). Bidirectional regulation of two DNA-damage-inducible genes, MAG1 and DDI1, from *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbiol.* 23. 777–789.
151. Vallen, EA., Ho, W., Winey, M. and Rose, MD. (1994). Genetic interactions between CDC31 and KAR1, two genes required for duplication of the microtubule organizing center in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 137(2):407-22.
152. Li, A., Xie, Z., Dong, Y., McKay, KM., McKee, ML. and Tanzi, RE. (2007). Isolation and characterization of the *Drosophila* ubiquilin ortholog dUbqln: in vivo interaction with early-onset Alzheimer disease genes. *Hum Mol Genet.* 16(21):2626-39.
153. Saeki, Y., Sone, T., Toh-e, A. and Yokosawa, H. (2002). Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 296(4):813-9.
154. Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Müller, B., Hanna, J. and Finley, D. (2004). Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J. Biol. Chem.* 279:26817–22
155. Andersen, KM., Hofmann, K. and Hartmann-Petersen, R. (2005). Ubiquitin-binding proteins: similar, but different. *Essays Biochem.* 41:49-67.
156. Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, KJ., Finley, D. and Dikic, I. (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature.* 453(7194):481-8.
157. Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsasser, S., Finley, D., Dikic, I, Walters KJ, Groll M. (2008). Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature.* 453(7194):548-52.
158. Yao, T., Song, L., Xu, W., DeMartino, GN., Florens, L., et al. (2006). Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1. *Nat. Cell Biol.* 8:994–1002
159. Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G. et al. (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 797-813.
160. Lindsley, D. and Zimm, G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. San Diego: Academic Press
161. Doll, RF., Kaufman, PD., Misra, S. and Rio, DC. (1989). Molecular biology of *Drosophila* P-element transposition. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 36:47-57.
162. Rubin, GM. and Spradling, AC. (1983). Vectors for P element-mediated gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 11(18):6341-51.

163. Spradling, AC. (1986). *Drosophila*, a Practical Approach. Roberts D (ed) pp 175–198, IRL Press, Oxford UK.
164. Duffy, J.B. (2002). Gal4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34: 1-15.
165. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
166. Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.
167. Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*. 9(1):28-32
168. Kurucz, É., Andó, I., Sümegi, M., Hölzl, H., Kapelari, B., Baumeister, W. and Udvardy, A. (2002). Assembly of the *Drosophila* 26S proteasome is accompanied by extensive subunit rearrangements. *Biochem. J.* 365:527–536.
169. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 68(5):850-8
170. Ashburner, M. (1989). *Drosophila*. A laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
171. Csizmók, V., Szollosi, E., Friedrich, P. and Tompa, P. (2006). A novel two-dimensional electrophoresis technique for the identification of intrinsically unstructured proteins. *Mol Cell Proteomics*. 5(2):265-73.
172. Arbeitman, MN., Furlong, EE., Imam, F., Johnson, E., Null, BH., Baker, BS., Krasnow, MA., Scott, MP., Davis, RW. and White, KP. (2002). Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 297(5590):2270-5.
173. Deveraux, Q., van Nocker, S., Mahaffey, D., Vierstra, R. and Rechsteiner, M. (1995). Inhibition of ubiquitin-mediated proteolysis by the *Arabidopsis* 26 S protease subunit S5a. *J. Biol. Chem.* 270: 29660-29663.
174. Kleijnen, M.F., Shih, A.H., Zhou, P., Kumar, S., Soccio, R.E., Kedersha, N.L., Gill, G. and Howley, P.M. (2000). The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol. Cell* 6: 409–419.
175. Ortolan, T.G., Tangaonkar, P., Lambertson, D., Chen, L., Schaubert, C. and Madura, K. (2000). The DNA repair protein Rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nat. Cell Biol.* 2: 601–607.
176. Raasi, S. and Pickart, C.M. (2003). Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin chains. *J. Biol. Chem.* 278: 8951–8959.
177. Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, KC., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K. and Dickson, BJ. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*. 448(7150):151-6.
178. Naito, Y., Yamada, T., Matsumiya, T., Ui-Tei, K., Saigo, K. and Morishita, S. (2005). dsCheck: highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 33. 589-91.
179. INPROTEOLYS Barcelona 2009. 4th Intracellular Proteolysis Meeting “Ubiquitin-Proteasome System, Dynamics and Targeting” A Biochemical Society Focused Meeting 27 - 29 May 2009
180. Isasa, M., Katz, E., Alsina, E., Gonzalez, S., Thomson, T., Finley, D. and Crosas, B. (2009). Regulation of the ubiquitin receptor Rpn10 by monoubiquitination (INPROTEOLYS Barcelona 2009. 4th Intracellular Proteolysis Meeting “Ubiquitin-Proteasome System, Dynamics and Targeting” A Biochemical Society Focused Meeting 27 - 29 May 2009)

ÖSSZEFOGLALÓ

Az eukarióta sejtekben a rövid féléletidejű (többnyire szabályozó funkciót betöltő) fehérjéket, valamint a rosszul feltekeredett, sérült fehérjéket az ubiquitin-proteaszóma rendszer bontja le. Ez az evolúciósan konzervált, összetett szabályozású biokémiai apparátus első lépésben szelektíven felismeri a lebontandó fehérjéket, és egy speciális poliubiquitin láncot (degradációs szignál) kapcsol kovalensen annak valamely lizinjére. A jelet az ún. poliubiquitin receptorok ismerik fel és kötik meg, majd a szubsztrátot végső állomásukra, a proteolitikusan aktív 26S proteaszómához szállítják. A poliubiquitin receptorok működésének és szabályozásának mechanizmusát ma még alig ismerjük.

Drosophila melanogaster modellállatot használva kimutattuk, hogy a muslica fő poliubiquitin receptorai a p54, a Rad23 és a Dsk2. Kísérleteink egyértelműen bizonyították, hogy a *Drosophila* proteaszómális (p54) és extraproteaszómális ún. UBA/UBL (Rad23 és Dsk2) poliubiquitin receptorainak koncentrációja az egyedfejlődés folyamán jelentősen változik, amely nem génexpressziós, hanem proteolitikus szinten szabályozódik. Kimutattuk, hogy a p54 mennyisége a többi proteaszóma alegységhez viszonyítva drasztikusan lecsökken a korai lárvastádiumokban, közvetlenül az embriógenézist követően. Ezután koncentrációja alacsony marad egészen a kései harmadik stádiumos vándorló lárvakorig, amikor újra emelkedni kezd, mígnem a báb és adult szakaszban visszaáll az eredeti, embriókban megfigyelt szintjére. A p54-hez hasonló fejlődésszádium-specifikus szabályozás figyelhető meg a Rad23 és Dsk2 poliubiquitin receptorok esetében is. *In vitro* és *in vivo* kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a poliubiquitin receptorok lebontását nem a 26S proteaszóma, hanem egy lárvakorban aktiválódott, szerin-proteáz család végzi. Az egyik homogenitásig tisztított és azonosított lárvális szerin-proteáz jellemzése jelenleg is folyamatban van. Megállapítottuk, hogy az enzim a p54, Rad23 és Dsk2 ún. rendezetlen szerkezetű szakaszaira specifikus, ami a poliubiquitin receptorok szabályozásának egy újfajta stratégiájára hívja fel a figyelmet.

A p54 *in vivo* sorsának nyomonkövetése érdekében az UAS/Gal4 rendszert alkalmazva p54, p54 N-terminális felet (NTF) és p54 C-terminális felet (CTF) túltermelő transzgénikus *Drosophila* törzseket hoztunk létre. A *daughterless-Gal4*-indukálta transzgénikus p54 és NTF termelődése nem okozott semmilyen fenotipikus elváltozást az állatban. Ennek feltehetően az az

oka, hogy habár mindkét fehérje az N-terminális vWA doménje révén be tudott épülni a 26S proteasómába, az endogén p54-hez viszonyított alacsony moláris koncentrációjuk miatt azonban nem gátolták az endogén p54 reasszociációját, így a proteasómák döntő többsége funkcióképes maradt. Ezzel szemben az ubiquitin interakciós motívumokat hordozó, vWA domén-mentes CTF transzgénikus fehérje nem épült be a proteasómába, és az állatok harmadik lárvastádiumban bekövetkező pusztulását okozta. Az extraproteasómálisan akkumulálódott transzgénikus CTF-ről kimutattuk, hogy mono- és/vagy oligoubiquitilálódott a terminális elhelyezkedésű konzervált lizinjein. Igazoltuk, hogy a CTF ubiquitilációja nem degradációs jel, hiszen a kovalensen módosult transzgénikus fehérje *in vivo* féléletideje több mint 2 nap volt. *In vitro* kísérleteink szerint a CTF ubiquitilációja többek között a fehérje rendezetlen szerkezetű részének stabilizálásához szükséges.

A terminális lizineket nem tartalmazó CTF-ΔK fehérje transzgénikus muslicáinkban nem ubiquitilálódott, és az állatok életben maradtak, ami azt sugallta, hogy a CTF ubiquitilálódásának köze van az állatok korai letalitásához. Ezt a feltevést bizonyítja az a kísérleti megfigyelés is, miszerint a p54, Rad23 és Dsk2 poliubiquitin receptorok fejlődéstartádium-specifikus szabályozása a CTF-ΔK-tútermelő állatokban a vad típushoz hasonlóan normálisan működik, míg a CTF-tútermelő transzgénikus állatok egyedfejlődése során zavart szenved. A zavar következtében a poliubiquitin receptorok mennyisége a megszokottnál korábban, már a második lárvastádium végén megnövekszik. Ennek hátterében a degradációjukat végző szerin-proteázt kódoló gén expressziójának gátlása áll, amit meglepő és mindmáig tisztázatlan módon az ubiquitilálódott és extraproteasómálisan felhalmozódott transzgénikus CTF okoz.

A CTF-tútermelő transzgénikus állatok különböző lárvastádiumaiban (szemben a vad típussal) nem csak a poliubiquitin receptorok, hanem a poliubiquitilált szubsztrátok is felszaporodtak. Ezt a látszólagos ellentmondást *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel oldottuk fel, és két okát határoztuk meg. Az első: kimutattuk, hogy a tútermeltetett CTF UIM-ai révén nagy mennyiségű poliubiquitilált fehérjét (feltehetően p54-specifikus szubsztrátok) képes megkötni, melyek emiatt nem jutnak el a proteasómához. A második: kimutattuk, hogy a Dsk2 poliubiquitin receptor a CTF-tútermelő transzgénikus muslicákban (a vad típussal ellentétben) nem kapcsolódott a 26S proteasóma regulátor komplexumához, hanem a CTF-fel együtt, az extraproteasómális térben dúsult fel. *In vitro* pull-down kísérletekkel igazoltuk, hogy a Dsk2 ubiquitin-szerű doménje (UBL) nagy affinitással kötődik a CTF (azaz a p54 C-terminális felének)

második és harmadik ubiquitin-interakciós motívumához (UIM). Tehát a CTF-túltermelő transzgénikus állatok lárváiban az extraproteasómálisan feldúsult CTF nem csak a p54 szubsztrátjainak lebontását gátolta, hanem UIM-aival csapdába ejtette az endogén Dsk2-t, ami a Dsk2 által szállított poliubiquitilált fehérjék akkumulálódását is előidézte.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a *Drosophila* fő poliubiquitin receptorai fejlődésstádium-specifikusan, proteolitikusan szabályozódnak, melyet egy lárvakorban aktiválódott szerin-proteáz irányít. A proteasóma saját poliubiquitin receptora, a p54 alegység képes leválni a regulátor komplexumról és kölcsönhatásba lépni a szubsztráttal töltött Dsk2-vel. Így a p54 ingázó faktor nem csak poliubiquitilált fehérjéket szállít a proteasómának, hanem valószínűleg meghatározza a többi poliubiquitin receptor proteasómához történő kapcsolódásának sorrendjét, valamint meggátolja az üres receptorok dokkolását a regulátor komplexumra. Hogy a p54 extraproteasómális funkcióját mi módon szabályozza a C-terminális konzervált lizinek ubiquitilációja, ma még nem tudjuk.

SUMMARY

In eukaryotes, the majority of short-lived (mainly regulatory) and misfolded proteins are degraded by the evolutionarily conserved ubiquitin-proteasome system. First, the substrate is recognized and covalently modified (polyubiquitylated) by the ubiquitin-ligase enzyme cascade. The special K48-type polyubiquitin-chain (degradation signal) is recognized and bound by the polyubiquitin receptors that deliver the substrate protein to the 26S proteasome holoenzyme for degradation. Unfortunately, our knowledge on the regulation and mode of action of polyubiquitin receptors is fairly limited.

We show here that in *Drosophila melanogaster* the main polyubiquitin receptors are p54, Rad23 and Dsk2. Our experiments unequivocally confirmed that in *Drosophila* the concentrations of the proteasomal (p54) and extraproteasomal (the UBA/UBL-type Rad23 and Dsk2) polyubiquitin receptors change in a developmentally regulated fashion. The stoichiometry of the proteasomal p54 polyubiquitin receptor subunit, relative to that of other regulatory particle (RP) subunits decreases drastically at the end of embryogenesis, remains low throughout the larval stages, starts to increase again in the late third instar larvae and remains high in the pupae, adults and embryos. A similar developmentally regulated fluctuation was observed in the concentrations of the Rad23 and Dsk2 extraproteasomal polyubiquitin receptors. We confirmed that this down-regulation is controlled by specific proteolytic processes, but definitely not at the gene expression level. Our *in vitro* and *in vivo* experiments revealed that the depletion of the polyubiquitin receptors at the end of embryogenesis is mediated by a serine-protease activated in larvae, but not by the 26S proteasome. We purified and identified a larval serine-protease, presumably specific for the intrinsically unstructured segments of p54, Rad23 and Dsk2. Although the characterization of the enzyme has not been finished yet, we know that such selectivity is a new level of the regulation of polyubiquitin receptors in *Drosophila melanogaster*.

To follow the *in vivo* fate of subunit p54, transgenic *Drosophila melanogaster* lines encoding the N-terminal half (NTH), the C-terminal half (CTH) or the full-length p54 subunit were established in the inducible Gal4-UAS system. The *daughterless-Gal4*-driven whole-body expression of the full-length subunit or its NTH did not produce any detectable phenotypic changes, and the transgenic products, through their amino-terminal von Willebrand-A (vWA) domain, were incorporated into the 26S proteasome. The transgene-encoded CTH, carrying the

ubiquitin-interacting motifs (UIMs) but lacking the vWA domain was unable to incorporate into the 26S proteasome, accumulated as a monomer protein and caused third instar larval lethality. The extraproteasomally accumulated CTH was found to be mono- and/or oligoubiquitylated on its terminal, conserved lysine residues. This modification, however, did not appear to be a degradation signal, because the half-life of the CTH was over 48 hours. We suppose that the ubiquitilation, among other things, is responsible for the stabilization of the unstructured region within CTH.

The unubiquitylated transgenic CTH-ΔK (lacks all the terminal lysines) similarly to the CTH accumulated in the extraproteasomal space, but didn't cause larval lethality or any detectable phenotypic abnormalities. This observation suggested that the ubiquitylation of the CTH is in correlation with the early lethality of transgenic, CTH over-expressing flies. While in CTH-ΔK expressing animals the larval down regulation of p54, Rad23 and Dsk2 is similar to the wild-type, the accumulation of the CTH transgenic protein disturbed the developmentally regulated changes of the polyubiquitin receptors. Build-up of subunit p54 in the RP had already started in 84-hour-old larvae (one day earlier than in wild-type) and reached the full complement characteristic of the non-larval developmental stages at the middle of the third instar larval stage, just before these larvae perished. Similar shifts were observed in the concentrations of the Rad23 and Dsk2 polyubiquitin receptors. The disturbance of the developmental regulation of polyubiquitin receptors is due to the inhibition of the specific serine-protease responsible for the elimination of the polyubiquitin receptors. Surprisingly, by an unknown mechanism, the extraproteasomally accumulated and ubiquitylated CTH transcriptionally arrested the expression of this serine-protease.

We have shown that in CTH over-expressing animals the accumulation of polyubiquitin receptors is accompanied by amass of polyubiquitylated protein substrates, as well. This paradoxon was resolved by two findings. Firstly, we have demonstrated that the CTH via its UIM motifs recruited p54-specific polyubiquitylated substrates suspending their proteasomal degradation. Secondly, the Dsk2 polyubiquitin receptor was unable to attach to the RP of the 26S proteasome, but similarly to the transgenic CTH protein, accumulated in extraproteasomal state. Using *in vitro* pull-down experiments we confirmed that the ubiquitin-like domain (UBL) of Dsk2 strongly and specifically binds the second and/or third ubiquitin-interacting motifs of CTH (actually the C-terminal half of p54). Thus, in CTH transgenic larvae the extraproteasomally

accumulated and ubiquitylated CTH protein inhibited the degradation not only of polyubiquitylated substrate proteins targeted to the 26S proteasome by the p54 subunit, but also of the Dsk2-targeted polyubiquitylated proteins by trapping the endogenous Dsk2 through its UBL domain. We suppose that the ubiquitylated CTH-dependent serine-protease inhibition and the accumulation of polyubiquitylated proteins caused the lethality in CTH transgenic larvae.

Our biochemical and genetic experiments revealed that the *Drosophila* main polyubiquitin receptors are proteolytically down-regulated during the larval stages by a special serine-protease. The p54 polyubiquitin receptor subunit of the 26S proteasome is able to dissociate from the RP and interact with the substrate-bound Dsk2. Accordingly the p54 is not only a simple polyubiquitin receptor, but possibly a discriminator that can define the priority of the docking of substrate-delivering polyubiquitin receptors to the proteasome. Regulation of the presumed extraproteasomal function of p54 by the ubiquitylation of its terminal lysines is not known at present.

MELLÉKLET

I. Felhasznált oligonukleotid primerek (5'→3'):

RT-PCR-hez

rpL17A Fw	GTGATGAACTGTGCCGACAA
rpL17A Rev	CCTTCATTTGCCCCTTGTTG
p54-1/3 Fw	CGAATTGCCCATCTGGTGCTGAA
p54-2/3 Rev	TGCCGTTGCTCCTCCATAGACACA
p48B-1/3 Fw	TAAGCAGTTCGCCAAGTTTCG
p48B-2/3 Rev	CAGCACCTTGATATTTCCGC
Rad23 Fw	GCGAAGCTTACAAATCGTTTTTATCAAGCG
Rad23 Rev	CGCAAGCTTTTAGCCGTTCTATTGCGTCCTTATC
Dsk2 Fw	CTTAAGCTTATGGCGGAAGGCGGCAGCAA
Dsk2 Rev	GGCTCGAGTTAACTCAAGGACAAGTGGTT

Klónozáshoz

Ddi1 Fw	CGGGATCCATGAAAATCACAGTGACGA
Ddi1 Rev	AAGAATTCTCAGCTGAGTTCGCTCCC
p42E Fw	ATGAATTCAATGTTTGGAAGACAAAGTG
p42E Rev	ATGTCGACCTACTTTTGCTTCTCCTCC
p48B-1/3 Fw	TAAGCAGTTCGCCAAGTTTCG
p48B-2/3 Rev	CAGCACCTTGATATTTCCGC
Rad23 Fw	GCGAAGCTTACAAATCGTTTTTATCAAGCG
Rad23 Rev	CGCAAGCTTTTAGCCGTTCTATTGCGTCCTTATC
Dsk2 Fw	CTTAAGCTTATGGCGGAAGGCGGCAGCAA
Dsk2 Rev	GGCTCGAGTTAACTCAAGGACAAGTGGTT

RNSi-hoz:

Dsk2-RNAi fw	GCTCTAGAGATGGCCGACAATCCAGCC
Dsk2-RNAi rev	GCTCTAGACAACGAGACCTGGGGCC
p54-RNAi fw	GCTCTAGACGTTGAAGTGCTGGCCACT
p54-RNAi rev	GCTCTAGAGTTGGCTTCGTTCTCTGCT

II. A felhasznált *Drosophila* törzsek azonosítója, tulajdonsága és egyszerűsített genotípusa:

C18: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely az UAS szabályozása alatt álló (p54 C-terminális fél) CTF-et kódoló DNS szekvenciát hordozza. (w^{1118} ; *If/CyO*; *P{UAST-p54-CTF}*)

8SC: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely az UAS szabályozása alatt álló Strep-p54-CTF-et kódoló DNS szekvenciát hordozza. (w^{1118} ; *If/CyO*; *P{UAST-Strep-p54-CTF}*)

ΔK: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely az UAS szabályozása alatt álló, terminális lizineket nem tartalmazó Strep-p54-CTF-ΔK-t kódoló DNS szekvenciáját hordozza. (w^{1118} ; *If/CyO*; *P{UAST-Strep-p54-CTF-ΔK}*)

Strep-p54(7): olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely az UAS szabályozása alatt álló Strep-p54-et kódoló DNS szekvenciáját hordozza. (w^{1118} ; *If/CyO*; *P{UAST-Strep-p54}*)

Strep-p54(7)/Dsk2^{Flag}: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely az UAS szabályozása alatt álló Strep-p54-et, valamint Flag-Dsk2-t kódoló DNS-ek szekvenciáit hordozza. (w^{1118} ; *P{UAST-Flag-Dsk2}*; *P{UAST-Strep-p54}*)

Strep-p54(7)/Dsk2^{Flag}: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely az UAS szabályozása alatt álló Strep-p54-et, valamint Flag-Rad23-at kódoló DNS-ek szekvenciáit hordozza. (w^{1118} ; *P{UAST-Flag-Rad23}*; *P{UAST-Strep-p54}*)

Strep-NTF: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely az UAS szabályozása alatt álló Strep-p54-NTF-et kódoló DNS szekvenciáját hordozza. (w^{1118} ; *If/CyO*; *P{UAST-Strep-p54-NTF}*)

p54^{RNSi}: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely da-Gal4-gyel bekeresztezve *Pros54*-specifikus (p54) dsRNS-t termel, mellyel a *Pros54* transzkriptum eliminálását idézi elő (RNS interferencia). (*w*; *P{UAST-p54(dsRNS)}*, *MKRS/TM6BTbHu*)

Δp54: a p54-et kódoló *Pros54* deléciós null-mutánsa (*w*; +; *ΔPros54/TM6bTbHu*, *GFP*)

Dsk2^{RNSi}: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely da-Gal4-gyel bekeresztezve *Ubiquilin*-specifikus (Dsk2) dsRNS-t termel, mellyel az *Ubiquilin* transzkriptum eliminálását idézi elő (RNS interferencia). (*w*; *P{UAST-Dsk2(dsRNS)}*, *MKRS/TM6BTbHu*)

Dsk2^{Flag}: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely az UAS szabályozása alatt álló Flag-Dsk2-t kódoló DNS szekvenciát hordozza (*w*; *P{UAST-Flag-Dsk2}*, *MKRS/TM6BTbHu*)

Rad23^{RNSi}: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely da-Gal4-gyel bekeresztezve *Rad23*-specifikus dsRNS-t termel, mellyel a *Rad23* transzkriptum eliminálását idézi elő (RNS interferencia). (*w*; *P{UAST-Rad23(dsRNS)}*, *MKRS/TM6BTbHu*)

Rad23^{Flag}: olyan P-elem inszerciós alaptörzs, amely az UAS szabályozása alatt álló Flag-Rad23-at kódoló DNS szekvenciát hordozza (*w*; *P{UAST-Flag-Rad23}*, *MKRS/TM6BTbHu*)

da-Gal4: olyan meghajtó törzs, amely minden szövetben és fejlődési állapotban Gal4 transzkripciósi faktort termel. (w^{1118} ; +; *P{da-Gal4}*)

da-Gal4/C18: a C18 és da-Gal4 keresztezésével létrehozott törzs, amely minden szövetben és fejlődési állapotban nagy mennyiségű CTF transzgénikus fehérjét termel. (w^{1118} ; *CyO/+*; *P{da-Gal4}/P{UAST-p54-CTF}*)

da-Gal4/8SC: a 8SC és da-Gal4 keresztezésével létrehozott törzs, amely minden szövetben és fejlődési állapotban nagy mennyiségű Strep-p54-CTF transzgénikus fehérjét termel. (w^{1118} ; *CyO/+*; *P{da-Gal4}/P{UAST-Strep-p54-CTF}*)

da-Gal4/ΔK: a ΔK és da-Gal4 keresztezésével létrehozott törzs, amely minden szövetben és fejlődési állapotban nagy mennyiségű Strep-p54-CTF-ΔK transzgénikus fehérjét termel. (w^{1118} ; *If/CyO*; *P{da-Gal4}/P{UAST-Strep-p54-CTF-ΔK}*)

- da-Gal4/Strep-p54(7):** a Strep-p54(7) és da-Gal4 keresztezésével létrehozott törzs, amely minden szövetben és fejlődési állapotban nagy mennyiségű Strep-p54 transzgénikus fehérjét termel. (w^{1118} ; $CyO/+$; $P\{da-Gal4\}/P\{UAST-Strep-p54\}$)
- da-Gal4/Strep-NTF:** a Strep-NTF és da-Gal4 keresztezésével létrehozott törzs, amely minden szövetben és fejlődési állapotban nagy mennyiségű Strep-NTF transzgénikus fehérjét termel. (w^{1118} ; $CyO/+$; $P\{da-Gal4\}/P\{UAST-Strep-p54-NTF\}$)
- Gal80^{ts20}/da-Gal4/C18:** olyan indukálható törzs, amelyben a termelődő Gal4 transzkripciós faktort 19-25°C-on gátolja a Gal80^{ts20} represszor, így nem termel CTF transzgénikus fehérjét. Permisszív hőmérsékleten (30°C) a represszor leválik a Gal4-ről és beindul a p54-CTF termelődése. (w^{1118} ; $P\{tubP-Gal80^{ts}\}20$; $P\{UAST-p54-CTF\}, P\{da-Gal4\}$)
- da-Gal4/Dsk2^{Flag}:** Dsk2^{Flag} és da-Gal4 keresztezésével létrehozott törzs, amely minden szövetben és fejlődési állapotban nagy mennyiségű Flag-Dsk2 transzgénikus fehérjét termel. (w^{1118} ; $P\{UAST-Flag-Dsk2\}/+; P\{da-Gal4\}/MKRS\}$)
- da-Gal4/Rad23^{Flag}:** a Rad23^{Flag} és da-Gal4 keresztezésével létrehozott törzs, amely minden szövetben és fejlődési állapotban nagy mennyiségű Flag-Rad23 transzgénikus fehérjét termel. (w^{1118} ; $P\{UAST-Flag-Rad23\}/+; P\{da-Gal4\}/MKRS\}$)
- da-Gal4/p54^{RNSi}:** a *Pros54* (p54) transzkriptum mennyiségét minden szövetben és fejlődési állapotban csökkentő törzs (w^{1118} ; $P\{UAST-p54(dsRNS)\}, P\{da-Gal4\}/MKRS\}$)
- da-Gal4/Dsk2^{RNSi}:** az *Ubiquilin* (Dsk2) transzkriptum mennyiségét minden szövetben és fejlődési állapotban csökkentő törzs (w^{1118} ; $P\{UAST-Dsk2(dsRNS)\}, P\{da-Gal4\}/MKRS\}$)
- da-Gal4/Rad23^{RNSi}:** az *Rad23* transzkriptum mennyiségét minden szövetben és fejlődési állapotban csökkentő törzs (w^{1118} ; $P\{UAST-Rad23(dsRNS)\}, P\{da-Gal4\}/MKRS\}$)
- da-Gal4/Strep-p54(7)/Dsk2^{Flag}:** a Strep-p54(7)/Dsk2^{Flag} és da-Gal4 keresztezésével létrehozott törzs, amely minden szövetben és fejlődési állapotban nagy mennyiségű Strep-p54 és Flag-Dsk2 transzgénikus fehérjét termel. (w^{1118} ; $P\{UAST-Flag-Dsk2\}/+; P\{da-Gal4\}/P\{UAST-Strep-p54\}$)
- da-Gal4/p54^{RNSi}/Dsk2^{RNSi}:** a *Pros54* (p54) és *Ubiquilin* (Dsk2) transzkriptumok mennyiségét minden szövetben és fejlődési állapotban csökkentő törzs (w^{1118} ; $P\{UAST-Dsk2(dsRNS)\}, P\{da-Gal4\}/P\{UAST-p54(dsRNS)\}$).
- da-Gal4/Strep-p54(7)/Rad23^{Flag}:** a Strep-p54(7)/Rad23^{Flag} és da-Gal4 keresztezésével létrehozott törzs, amely minden szövetben és fejlődési állapotban nagy mennyiségű Strep-p54 és Flag-Rad23 transzgénikus fehérjét termel. (w^{1118} ; $P\{UAST-Flag-Rad23\}/+; P\{da-Gal4\}/P\{UAST-Strep-p54\}$)
- da-Gal4/p54^{RNSi}/Rad23^{RNSi}:** a *Pros54* (p54) és *Rad23* transzkriptumok mennyiségét minden szövetben és fejlődési állapotban csökkentő törzs (w^{1118} ; $P\{UAST-Rad23(dsRNS)\}, P\{da-Gal4\}/P\{UAST-p54(dsRNS)\}$).